Libros de Cátedra

Análisis farmacéutico

María Guillermina Volonté
Pablo Quiroga (coordinadores)

FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS

exactas

Editorial de la Universidad de La Plata

Universidad Nacional de La Plata

ANÁLISIS FARMACÉUTICO

María Guillermina Volonté - Pablo Quiroga
(coordinadores)

Cátedra Control de Calidad de Medicamentos
Área Ciencias Farmacéuticas – Departamento Ciencias Biológicas

2013

Volonté, María Guillermina

Análisis farmacéutico / María Guillermina Volonté y Pablo Quiroga; colaboradora María Esperanza Ruiz ; Claudia Marano ; Patricia Retaco. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2013.

E-Book: ISBN 978-950-34-1036-3

1. Farmacología. I. Quiroga, Pablo II. Ruiz, María Esperanza, colab. III. Marano, Claudia, colab. IV. Retaco, Patricia , colab. V. Título

CDD 615.1

Fecha de catalogación: 25/10/2013

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata

47 N.º 380 / La Plata B1900AJP / Buenos Aires, Argentina
+54 221 427 3992 / 427 4898
editorial@editorial.unlp.edu.ar
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2013
ISBN 978-950-34-1036-3

A la Universidad Nacional de La Plata

A nuestros alumnos

“La excelencia es el arte que se alcanza a través del
entrenamiento y del hábito,
nosotros somos lo que hacemos repetidamente,
la excelencia entonces, no es un acto, sino un hábito”
Aristóteles

ÍNDICE

PRÓLOGO

Jean Cocteau decía que escribir era un acto de amor. Y es probable que así sea, porque difícilmente el escritor lo hace tan sólo para satisfacerse a sí mismo. De todos modos el escritor de ficciones o de ensayos raramente llegue a conocer a la mayoría de sus lectores, a diferencia del autor de un texto, que seguramente tomará contacto con algunos de ellos (sus futuros alumnos).
Y este hecho le otorga características especiales al acto de escribir, reafirmando que se trata de un acto de amor, como lo es la enseñanza en sí misma, sea oral (presencial o virtual) o escrita.

Un libro de texto tiene destinatarios precisos y en las así llamadas "ciencias duras" el autor subordina la redacción de cada frase a las premisas que condicionan el ejercicio de la docencia en estas disciplinas: esto es, claridad y concisión en la información que se brinda. El libro que coordinan los profesores Volonté y Quiroga y en el que colaboran destacados docentes del área de control de la calidad de medicamentos de la Facultad de Ciencias Exactas es un fiel ejemplo de lo dicho. Los autores han dedicado un tiempo precioso para que los alumnos no dilapiden el suyo (un bien escaso entre los estudiantes universitarios) en la búsqueda de bibliografía dispersa y/o de difícil acceso. El hecho es que –en este caso- los estudiantes avanzados de la carrera de Farmacia podrán disponer (y disfrutar) de un material de estudio de gran utilidad, no sólo por la calidad intrínseca del mismo sino porque enriquece un acervo bibliográfico no demasiado abundante en obras de esta disciplina en lengua castellana.

La obra que ha sido titulada sobriamente "Análisis Farmacéutico", contiene información precisa sobre los contenidos esenciales del control de calidad de medicamentos, el aseguramiento de la calidad farmacéutica, la validación de metodologías analíticas y bioanalíticas, así como ensayos específicos para avalar la performance de distintos tipos de formas farmacéuticas y productos biofarmacéuticos.

Los coordinadores exhiben antecedentes académicos y científicos que garantizan el nivel de excelencia alcanzado por el texto que ahora se pone a disposición de alumnos y graduados: la Dra. Volonté es miembro de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, integra la Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina y posee una vastísima experiencia en la docencia de grado y de posgrado en nuestro país y en el exterior; por su parte el Lic. Pablo Quiroga, quien realizó un Master Universitario en Toxicología en la Universidad de Sevilla, desarrolla su actividad docente en Control de Calidad de Medicamentos y en Toxicología Farmacéutica, participando además en la Subcomisión de Controles Toxicológicos de la Farmacopea Argentina.

Finalmente, corresponde felicitar a las autoridades de la Universidad Nacional de La Plata por esta valiosa iniciativa de brindar a sus calificados docentes la posibilidad de acercar a alumnos de las diversas disciplinas que se cultivan en esa Casa de Altos Estudios una bibliografía moderna y actualizada.

Néstor O. Caffini

La Plata, Marzo de 2013

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN AL CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS

María Guillermina Volonté

Garantía de Calidad de Medicamentos

Los farmacéuticos que se dedican a la elaboración de medicamentos, ya sea a nivel industrial, oficinal u hospitalario, deben asegurar que los mismos sean adecuados para su uso previsto, es decir, no expongan a los pacientes a riesgos debidos a defectos en la seguridad, calidad o eficacia de ellos.

Para que un medicamento pueda considerarse de buena calidad debe estar elaborado con procedimientos técnicos adecuados, que cumplan en forma estricta normas internacionales de fabricación. Por supuesto que la calidad no la da el control de calidad en sí mismo, sino que debe estar incorporada en el producto. De nada servirá disponer de un laboratorio o servicio de control de calidad que detecte todos los defectos de un lote de medicamentos, si la producción es defectuosa en sí misma y por lo tanto ese medicamento ya no cumplirá con su objetivo fundamental: llegar a manos de un paciente ofreciéndole eficacia y seguridad. Es decir, la calidad del medicamento dependerá de cómo fue elaborado. Este paradigma de “fabricar con calidad” generó un verdadero cambio conceptual en el enfoque que se le daba al tema.

Esta calidad habrá que asegurarla tanto en la Industria Farmacéutica, como en la Oficina de Farmacia y en la Farmacia Hospitalaria. Durante mucho tiempo se consideró erróneamente que la noción de control de calidad de medicamentos solo era competencia de la industria farmacéutica, sin embargo, las preparaciones magistrales y la fabricación a nivel hospitalario, también deben someterse a reglas precisas, si bien es cierto que requieren una consideración diferente a aquellas fabricaciones de nivel industrial. Lo importante es que en ningún caso puede estar ausente la idea central de obtener un producto eficaz y seguro para el paciente, es decir, de buena calidad.

Mientras que la eficacia se define como la capacidad de un medicamento para obtener la acción terapéutica buscada, en tiempo y forma, se entiende que un medicamento es seguro en tanto los riesgos que tenga para el paciente solo resulten aceptables en términos de un análisis riesgo-beneficio.

Qué entendemos por Calidad? En líneas generales podemos decir que calidad es la capacidad de un producto, de un proceso o de un servicio, de satisfacer las necesidades del usuario. En nuestro caso el producto es el medicamento, el proceso es la elaboración propiamente dicha de éste y el servicio es su dispensa, mientras que el usuario es el paciente.

Todos los pacientes deben tener la certeza que el medicamento que consumen: no se haya contaminado, se haya fabricado de acuerdo a una formulación correcta, permanezca en su estado original y no se haya deteriorado y se encuentre en un envase correcto e inviolable, para evitar daños o contaminaciones en su transporte y almacenamiento.

Cómo aseguramos la calidad de los medicamentos? Para conseguir el objetivo de calidad de forma confiable es necesario un sistema de Garantía de Calidad, diseñado globalmente y aplicado en forma adecuada según las Buenas Practicas de Elaboración de Productos Farmacéuticos, habitualmente denominadas GMP, en referencia a las siglas de su nombre en inglés (Good Manufacturing Practice) y según el Control de Calidad, propiamente dicho.

Estos conceptos guardan una estrecha relación entre sí, cuando hablamos de Garantía de calidad no estamos diciendo otra cosa que Aseguramiento de la Calidad, por lo tanto será la suma total de actividades organizadas, con el objetivo de garantizar que los medicamentos posean la calidad requerida para su uso previsto, es decir que comprenderá todas aquellas acciones, planificadas y sistematizadas, necesarias para proveer adecuada confianza de que un material o un proceso, cumplirá los requisitos de calidad establecidos. Por lo tanto, es un concepto amplio que abarca todos los aspectos que, individual o colectivamente, influyen en la calidad del producto.

Un sistema de Garantía de Calidad adecuado para la elaboración de medicamentos debe asegurar el diseño y desarrollo de los medicamentos, que las operaciones de producción y control estén claramente especificadas, que

se tomen todas las medidas adecuadas para la elaboración, que se realicen todos los controles necesarios de los productos intermedios y del producto terminado y cualquier otro tipo de control durante el proceso, validándose todos ellos, y por último que se garantice que los medicamentos se almacenan y distribuyen de forma que su calidad se mantenga íntegra hasta la fecha de vencimiento.

El Sistema de Garantía de Calidad sustituye el antiguo concepto que suponía que la calidad era competencia únicamente del servicio de control de calidad del laboratorio farmacéutico.

Antes solamente se consideraban los controles de calidad en las distintas fases de la elaboración: materias primas, material acondicionamiento, proceso y producto.

Ahora se debe operar de acuerdo a normas que disminuyan errores y garanticen un producto de calidad.

Buenas Prácticas de Manufactura (GMP)

Las GMP son la parte de la Garantía de Calidad que asegura que los productos se elaboran de forma homogénea y se controlan para conseguir los niveles de calidad adecuados a su uso previsto. Se refieren tanto a la producción como al control de calidad.

Las GMP abarcan todos los aspectos del proceso de fabricación: locales, almacenamiento y transporte adecuados; personal calificado y capacitado para la producción y el control de la calidad; descripciones detalladas de las tareas a realizar y organigrama de trabajo de cada sección; programas de higiene y salud del personal y detalle de la especial vestimenta que deberán poseer.

Los laboratorios deberán ser apropiados y estar diseñados, construidos y mantenidos de acuerdo a las operaciones a realizar; con iluminación, temperatura, humedad y ventilación adecuadas.

Podemos distinguir varias áreas en un establecimiento de elaboración de medicamentos, que cumpla con las GMP:

- Áreas Accesorias: vestuarios, talleres, descanso, etc.
- Áreas de Almacenamiento: de materiales, productos, recepción, muestreo, materiales aprobados o rechazados o en cuarentena, psicotrópicos, impresos, etc.
- Áreas de Pesaje: parte del área de almacenamiento o de producción.
- Áreas de Producción: independientes según el producto, almacenamiento durante proceso, envasado, etc.
- Áreas de Control de calidad: equipos, muestras, referencias.

Procedimientos e instrucciones escritas aprobadas; registros donde consten todas las etapas de los procedimientos definidos adoptados; posibilidad de seguir un producto en todas sus etapas mediante registros de procesado de lotes y registros de distribución y por último sistemas para la investigación de reclamos mediante procedimientos escritos, personal a cargo, registros, investigación, acciones a seguir (correctivas y/o preventivas), plan de acción para eliminar la causa del problema, plan de seguimiento y retiro de productos del mercado farmacéutico, que se efectúa una vez que es identificado el defecto, requiriendo también procedimientos escritos, información a las autoridades sanitarias y un almacenamiento segregado del producto retirado y del stock remanente.

Respecto a los tipos de defectos y la premura con que se tomen acciones frente a estos, podrán ser:

- Críticos: constituyen un riesgo para la vida del paciente: etiquetado incorrecto, potencia incorrecta, contaminación microbiana, etc.
- Mayores: pueden poner al paciente en riesgo de reacciones adversas: información en prospectos o rótulos incompleta o incorrecta, falta de cumplimiento de ciertas especificaciones, etc.
- Menores: constituyen un riesgo menor para el paciente: empaque y/o cierre defectuoso, contaminaciones menores, etc.

Entre otros documentos que deberán llevarse para cumplir con las GMP podemos mencionar a las: **Especificaciones**, es decir los requisitos que tienen

que cumplir los productos o materiales utilizados u obtenidos, generalmente serán las que codifiquen las Farmacopeas más reconocidas.

Fórmula Patrón, Método Patrón e Instrucciones de acondicionamiento, incluyendo a las materias primas utilizadas y las operaciones de elaboración y acondicionamiento.

Procedimientos, forma de realizar ciertas operaciones (limpieza, vestuario, muestreo).

Protocolos, historia de cada lote de producto.

Rótulos, internos y de los productos.

Además se deben validar las fases críticas de los procesos de elaboración es decir aquellas que pueden causar variación en la calidad final del producto farmacéutico, por ejemplo el mezclado y homogenización de los polvos en el proceso de elaboración de comprimidos.

Las GMP tienen como objetivo fundamental disminuir los riesgos inherentes a la producción farmacéutica, en especial riesgos provenientes de una contaminación cruzada o de una confusión provocada por un rotulado equivocado. De esta manera se disminuyen los riesgos inherentes a toda producción farmacéutica, que no pueden prevenirse completamente mediante el control final del producto.

En nuestro país las Autoridades Regulatorias (ANMAT/INAME) adoptaron las Buenas Prácticas de Manufactura emitidas por la OMS y actualizadas en 1992, que figuran en la Farmacopea Argentina (FA VII ed. año 2003), capítulo <1020>

Cuando una persona se acerca por primera vez a estos conceptos, puede pensar que es algo sencillo, pero en la práctica no lo es. Uno de los principales agentes que producen contaminación, confusiones y errores son las personas.

Los principales tipos de contaminantes, característicos de la industria farmacéutica, son:

- Contaminación por partículas, polvo o suciedad.
- Contaminación por mezcla errónea de componentes, como parte de la formula farmacéutica.
- Contaminación por microorganismos.

La aplicación estricta de las GMP evita cualquiera de estas contaminaciones.
La meta de las GMP es garantizar productos seguros y que tengan la identidad, eficacia, pureza y calidad que el fabricante expresa que tiene.
Por qué deben cumplirse estas condiciones?
Seguridad: porque el producto debe ser destinado para consumo humano, sin efectos adversos o tóxicos debidos a errores de elaboración.
Identidad: porque debe tener lo que declara su rótulo, sin excepción ni errores.
Potencia: porque debe tener la concentración correcta para ser efectivo en su acción.
Pureza: porqué tiene que ser puro, es decir, sin contaminantes
Calidad: porque siempre debe elaborarse igual, con los mismos estándares de calidad.
El principio rector de las GMP debe ser que la calidad forma parte integral de la elaboración del medicamento, y no es algo que meramente se somete a prueba en el producto. Por consiguiente, con esto se asegura que el producto no sólo cumple con las especificaciones finales, establecidas por las Farmacopeas en su monografía respectiva, sino que se ha fabricado por los mismos procedimientos y en las mismas condiciones cada vez que se elabora.
Hay muchas formas de lograr esto: la validación es la parte de las GMP por la cual se logra que los sistemas, los equipos, los procesos y los procedimientos para los ensayos de calidad estén bajo control y, por consiguiente, se produzca uniformemente un producto de calidad.

Control de Calidad

En cuanto al Control de Calidad, es la parte de las GMP que se refiere al muestreo, especificaciones y ensayos necesarios para que las materias primas, material de acondicionamiento y productos terminados, sean considerados de buena calidad y por lo tanto aprobados para su distribución y dispensación.
El Departamento de Control de Calidad debe ser independiente de otros departamentos, en especial del de Producción, y estar bajo la autoridad de una

persona calificada y experimentada, que tenga a su disposición uno o más laboratorios de control. Debe contar con recursos suficientes para asegurar que los procedimientos de control de calidad pueden efectuarse con eficacia y confiabilidad.

Un medicamento es un producto complejo que requiere un protocolo de control, que solo puede garantizarse mediante la utilización de métodos analíticos apropiados.

Los requisitos básicos de un correcto control de calidad contemplan la realización del muestreo y control de materias primas, material de acondicionamiento y producto terminado, así como también del medio ambiente donde se elaboren los productos, que serán llevados a cabo por personal adecuado, es decir entrenado y calificado, mediante la aplicación de métodos analíticos validados, y llevando una documentación organizada de todos los pasos.

Además se encargarán de los estudios de estabilidad de nuevos productos, de que se mantenga una investigación analítica permanente para la actualización y validación de los métodos.

Será este departamento responsable de las sustancias de referencia, utilizadas en los ensayos de control de calidad, así como también de las contra muestras de cada lote analizado.

Buenas Prácticas de Laboratorio

Los laboratorios de control de calidad hoy en día deben organizarse de tal manera que trabajen bajo estrictas normas de Buenas Prácticas de Laboratorio o GLP, en referencia a las siglas de su nombre en inglés (Good Laboratory Practice), asegurando que los resultados obtenidos en dicho laboratorio sean confiables, para lo cual se deben disponer de reglas, procedimientos y prácticas que aseguren la calidad y rectitud de dichos resultados.

Las GLP establecen requisitos de aptitud de instalaciones, de métodos debidamente validados, de reactivos en cuyos rótulos deberá figurar la

identificación del contenido del envase, su concentración o título, la fecha de preparación, de valoración y de vencimiento, así como las condiciones de almacenamiento. Respecto a los equipos deberán estar correctamente verificados, limpios y con un mantenimiento actualizado. Todo estará debidamente documentado o registrado. Por ello es tan importante llevar al día Procedimientos Normalizados de Trabajo, denominados también Procedimientos Operativos Estándar, que son documentos que describen como llevar a cabo ciertas actividades o ensayos de rutina. Se escriben para los siguientes casos:

- Inspecciones de rutina, limpieza, mantenimiento, control y calibración de equipos
- Acciones frente a fallas de equipos
- Métodos analíticos
- Almacenamiento, manipuleo y descarte de materiales
- Precauciones referentes al cuidado de la salud y la seguridad

Estos procedimientos deben ser escritos detalladamente como para que el analista no tenga que realizar consultas continuamente, pero sin crear confusión.

Se deben guardar en el archivo general del laboratorio y copias en los lugares de trabajo, archivando correctamente tanto los que están en vigencia como las versiones anteriores.

En el caso de los equipos de laboratorio lo importante es obtener resultados confiables con ellos, en tiempos razonables, con una actualización constante de la tecnología, por lo cual se deben contar con instrumental y equipos adecuados, con un correcto mantenimiento y calibración y con personal capacitado y calificado.

Con respecto a la calificación de los equipos, podemos mencionar tres tipos de procedimientos:

Calificación de Instalación (IQ). Se verifica que todos los aspectos claves de la instalación se cumplan de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Ejemplos: descripción del equipo, información del fabricante, especificaciones

del diseño del equipo, información del mantenimiento, procedimientos de operación, planos de instalación, etc.

Calificación de Operación (OQ). Se verifica que todos los equipos funcionen de la forma esperada y sean capaces de operar satisfactoriamente sobre todo el rango de los parámetros operacionales para los que han sido diseñados. La finalidad es demostrar que el sistema, maquinaria y/o equipo involucrado opera correctamente una vez que se ha concluido la calificación de instalación.

Calificación de Funcionamiento (PQ). Es el programa documentado que demuestra la efectividad y reproducibilidad del proceso bajo condiciones normales de operación y bajo condiciones límites de operación. Los aspectos incluidos en esta calificación son específicos para cada equipo, sistema o proceso. Se llama también Calificación de Desempeño.

Tecnología Analítica de Proceso

Los últimos avances en calidad están dados por el Proceso PAT (Process Analytical Technology) ó Tecnología Analítica de Proceso, al cual podemos definir como una oportunidad para mejorar y optimizar los procesos productivos y la calidad de los productos farmacéuticos.

PAT es un sistema para diseñar, analizar y controlar la elaboración por medio de medidas en línea de los atributos definidos como críticos en las materias primas, productos intermedios, terminados y en el proceso en sí mismo. El término “analítico” en PAT tiene una definición amplia, abarcando cuestiones químicas, físicas, microbiológicas, matemáticas y de análisis de riesgo, trabajando en forma conjunta.

Los objetivos de trabajar con PAT son, entre otros, incrementar profundamente el conocimiento de los procesos productivos. El concepto de “calidad por diseño” se basa en este conocimiento acabado del proceso ya que solo con este conocimiento vamos a ser capaces de monitorear y controlar efectivamente un proceso. Debemos conocer los puntos críticos y saber qué propiedades medir en los mismos. Trabajar activamente para reducir la

variabilidad de los mismos y reducir los muestreos y análisis off-line. Predecir la calidad del producto final por medio de medidas efectuadas en diferentes pasos de la elaboración del mismo.

Esto permitirá la liberación rápida de productos y la desaparición de eventuales “sorpresas desagradables” cuando se está esperando la salida de un producto, así como minimizar los potenciales riesgos de no conformidades y problemas regulatorios.

PAT es una forma de control de calidad “en línea” que permite realizar pequeños ajustes en un lote en tiempo real, de modo que se pueda mantener su calidad y completar el proceso de acuerdo con un programa establecido.

Un sistema PAT consiste en sensores conectados en red a sistemas computacionales que realizan aplicaciones analíticas para procesar en tiempo real datos en bruto sobre los lotes.

No obstante, si no se cuenta en forma permanente con computadoras, redes y sistemas de almacenamiento adecuados, los sistemas PAT serán menos útiles que los procesos manuales. La infraestructura IT (Tecnología de la Información) deberá superar niveles estándares de confiabilidad, disponibilidad y tiempo de funcionamiento.

Las principales herramientas utilizadas en un sistema PAT son:

- Herramientas multivariantes para el diseño, adquisición de datos y análisis. Existen métodos que pueden adquirir información de múltiples atributos en forma simultánea y no destructiva.
- Analizadores de procesos
- Herramientas de control de proceso. En los procesos clásicos la variabilidad no medida de propiedades de los componentes hace que el resultado no sea el esperado, para evitar esto se pueden utilizar métodos que permitan medir variables críticas “en–tiempo” PAT y así detener un proceso cuando se alcanza la condición óptima.
- Herramientas de mejora continua y gestión del conocimiento adquirido.

Ejemplos: Análisis en línea de la humedad remanente en un proceso de secado en un secadero de lecho fluido y seguimiento de un proceso de mezclado.

Ambos ejemplos están basados en técnicas espectrofotométricas utilizando la zona del infrarrojo cercano (NIR) ya que ha demostrado ser una zona con información muy útil para obtener datos de sustancias y procesos en forma no destructiva.
Otro ejemplo: Sensores instalados en la línea de producción que alimentan datos continuos de pH en un modelo PAT matemático. El sistema PAT detecta una significativa disminución de la acidez del lote y comunica la novedad al técnico en tiempo real, quién hace las correcciones necesarias para superar el problema.

Garantía de Calidad de Formulaciones Magistrales

Cuando hablamos de medicamentos elaborados en la farmacia oficinal u hospitalaria nos referimos a las Formulaciones Magistrales, cuya definición nos dice que son medicamentos destinados a un paciente individualizado, elaborado por el farmacéutico, o bajo su dirección, para cumplimentar una prescripción detallada de los principios activos que incluye, según las normas técnicas y científicas del arte farmacéutico, dispensado en su farmacia y con la debida información al paciente.
No debe confundirse con Preparaciones Oficinales, que son aquellos medicamentos de acción terapéutica comprobable, distinguidos con un nombre genérico y que puede prepararse en la oficina de farmacia. Para su expendio a semejanza de la especialidad farmacéutica o medicinal, deberá presentar una forma farmacéutica estable, envasarse uniformemente y sujetarse a la autorización previa de la Secretaría de Salud Pública de la Nación. El término preparación magistral tampoco debe asociarse al de medicamento o Preparado Oficial, que es todo medicamento inscripto en la Farmacopea y que por tanto puede prepararse libremente en la oficina de farmacia.

Las formulaciones magistrales constituyen una parte integral de la práctica farmacéutica y son esenciales para la administración del cuidado de la salud.

Algunas de las características que las diferencian de las especialidades medicinales elaboradas en la industria, incluye la existencia de una relación específica entre el farmacéutico, el paciente y el profesional prescriptor, logrando tratamientos individualizados que responden a necesidades particulares.

Dentro de las pautas de actuación tendientes a optimizar la prescripción y dispensación de estos medicamentos, debemos considerar que solamente deberán ser utilizadas para cubrir vacíos terapéuticos (caso de medicamentos pediátricos no elaborados por las industrias farmacéuticas) o adaptar los medicamentos a los pacientes (modificación de la forma farmacéutica para lograr una mejor aceptación por parte del paciente, por ejemplo comprimidos muy voluminosos destinados a pacientes con problemas de deglución). Salvo que, mediante una variación de la dosis del principio activo o del excipiente se pretenda una adaptación del medicamento a la situación clínica del paciente, no se justifica una preparación magistral cuya composición sea igual que la de una especialidad ya comercializada. De existir una especialidad que posea el o los mismos principios activos prescriptos en cantidad igual a la especificada en la prescripción, con idéntica vía de administración y que no contenga entre los componentes de la formulación sustancias no toleradas por el paciente, se preferirá siempre la dispensación de la especialidad.

Por otra parte no se deberán utilizar principios activos retirados del mercado, por su ineficacia o falta de seguridad. Se debe procurar no asociar más de dos principios activos, salvo en aquellos casos en los que esa asociación esté claramente indicada. Este principio se ajusta a los criterios del uso racional de medicamentos, según los cuales son pocas las ocasiones en que es necesario asociar más de dos principios activos. De esta manera se evitan los riesgos de incompatibilidades físico-químicas que pueden afectar negativamente el efecto farmacológico.

No se debe elaborar, ni dispensar más cantidad de la estrictamente necesaria. Se evitarán así problemas de inestabilidad, de mayor consumo de dosis por parte del paciente, etc.

Se recomienda elegir cuidadosamente los excipientes. Considerar siempre las posibles incompatibilidades entre el principio activo y los excipientes

Facilitar siempre instrucciones al paciente. Las formulaciones magistrales tienen que ir siempre acompañadas de la información suficiente que garantice su correcta identificación y conservación y su segura utilización.

Los casos en que se aconseja la utilización de preparados magistrales son para pacientes que responden mejor con fármacos que no se encuentran en el mercado, o pacientes que necesitan dosis de principios activos que no se encuentran en las especialidades, pacientes con afecciones dermatológicas o con problemas de intolerancia a determinados excipientes o que necesitan una vía de administración no habitual.

Las Buenas Prácticas de Elaboración de Magistrales comienzan con el diseño de la formulación, desde el momento de la recepción de la receta. Por lo cual se debe estudiar y evaluar la prescripción, en especial la posología de los principios activos, los excipientes y la cantidad de fórmula a preparar, para, si fuese necesario, proponer modificaciones al prescriptor. A su vez, si fuera necesario, se deberá recoger información del paciente, para complementar la que suministra la receta, como por ejemplo, perfil farmacológico del paciente, modo de aplicación del producto, etc.

El diseño galénico, es probablemente el acto más importante desde el punto de vista farmacéutico para asegurar la calidad final.

Las normas o pautas de correcta elaboración no se adoptan únicamente en un sentido evaluador del producto terminado, sino que incluyen también al personal responsable de la elaboración y al local o laboratorio de magistrales, que deberá estar diferenciado en la farmacia, totalmente independiente del lugar de atención al público y del depósito, adecuadamente diseñado para realizar en él la elaboración de los preparados. Deberá estar diseñado de forma que tenga superficies lisas de fácil limpieza, fácilmente lavado, desinfectado e incluso esterilizado si fuere necesario. Ninguna de las superficies que puedan entrar en contacto con el producto ha de ser susceptible de afectar la calidad del medicamento o de sus componentes.

Los equipos a usar deberán ser adecuados a la preparación que se va a elaborar y compatibles con las materias primas a utilizar, fáciles de limpiar y calibrados, sobre todo la balanza, y otros elementos de medidas, como probetas, etc. En el caso de pesadas de sustancias muy activas, se recomienda efectuar las diluciones adecuadas para dar más exactitud a la pesada y facilitar la posterior mezcla de las sustancias.

Las materias primas son fundamentales en este caso, pues de su calidad dependerá sustancialmente el resultado del producto final. Se entiende por materia prima todo producto que participe en la composición de una fórmula magistral, ya sea principio activo o excipientes. Como es lógico la calidad de la materia prima va a ser un determinante de la calidad del producto final. El farmacéutico debe garantizar la adecuación de los productos que utiliza, para ello deberá tener en cuenta el origen de las materias primas, el control analítico de las mismas, (realizado por el proveedor, quién deberá suministrar un Certificado Analítico de las materias primas, por un tercero o en su defecto por el propio farmacéutico). Deberá poner atención en la recepción de las mismas examinándolas para verificar su integridad, aspecto y etiquetado del envase. Se deberá etiquetar adecuadamente cada materia prima, constando nombre y número de lote, fecha de recepción, si se ha controlado, fecha de vencimiento, condiciones especiales de almacenamiento, etc.

Los documentos constituyen una parte fundamental del sistema de control de calidad, pues permiten autentificar los procesos realizados y supervisar “a posteriori” su desarrollo. Estos documentos deberán ser claros y concisos para facilitar la rápida comprensión de los mismos. Deberán mantenerse registros y documentos generales, relativos a la materia prima, al material de acondicionamiento y al producto terminado. En general deberán documentarse procedimientos de limpieza del local y del material, normas de higiene del personal, lista de proveedores, registros de materias primas y de envases, fichas de análisis de materias primas, procedimientos de elaboración de fórmulas magistrales y datos de su dispensación (Libro Recetario).

Los residuos de origen químico serán evacuados en forma regular, en recipientes adecuados, y bajo las consideraciones legales correspondientes a residuos patogénicos.

En la Oficina de Farmacia la garantía de calidad alcanza su máxima importancia en la fase de la preparación propiamente dicha. Consistirá en la aplicación de técnicas y procedimientos que permitan asegurar que se alcanzará el objetivo de un producto no desviado del óptimo, establecido en su diseño. Se deberán realizar comprobaciones previas a la elaboración como por ejemplo: verificar que en la zona de trabajo no existan otras materias primas que las necesarias para esa preparación en particular, la limpieza del local, equipos preparados y calibrados, documentos disponibles, etc. Luego están las acciones propias de la elaboración, todas realizadas por el farmacéutico o bajo su supervisión, como por ejemplo: pesadas, medidas, etc. En el caso de productos poco estables y/o tóxicos, se manipularán conforme a procedimientos escritos de manejo de los mismos. Durante la preparación se irá cumpliendo la ficha de elaboración previamente diseñada. El envasado se hará acorde con la formulación en particular.

Por último un correcto etiquetado, la información al paciente, oral y escrita, las pautas para la conservación y el establecer una fecha de vencimiento, son el valor agregado a los medicamentos magistrales que jerarquizan la dispensación.

En la etiqueta deberán figurar los siguientes datos: composición cuali y cuantitativa de los principios activos (utilizando el nombre en español de la Denominación Común Internacional de la OMS, no aceptándose las sinonimias o nombres alternativos); descripción cualitativa de los excipientes; forma farmacéutica, vía de administración y cantidad dispensada; número de registro en el libro recetario; fecha de preparación; fecha de vencimiento; condiciones de conservación; nombre del paciente.

La dispensación de un medicamento debe ir siempre acompañada de la información al paciente necesaria para su correcta utilización, toda la información tanto oral como escrita, deberá ser suministrada por el farmacéutico. Si el envase lo permite esta información podría consignarse en el

rótulo adherido al mismo, de no ser posible se puede entregar en hoja aparte. La información constará al menos de: identificación de la formulación, forma farmacéutica y vía de administración, precauciones, contraindicaciones, incompatibilidades, interacciones, efectos secundarios, intoxicación y su tratamiento, normas de correcta administración, condiciones de conservación y advertencias, nombre, dirección y teléfono de la Farmacia.

Las pautas para la conservación es una actividad que deberá ser desarrollada con especial atención por el farmacéutico y las instrucciones que dará al paciente son las siguientes: guardar los preparados al abrigo de la luz y en un lugar fresco y seco (nunca en el cuarto de baño); conservarlos en heladera cuando es necesario, no siempre, puesto que algunas formulaciones pueden alterarse con los cambios de temperatura; mantener los envases abiertos el menor tiempo posible y asegurarse que queden bien cerrados; consultar al farmacéutico frente a cualquier cambio observado en la formulación, etc.

Respecto a la fecha de vencimiento, se deberá tener en cuenta que los preparados farmacéuticos se hacen con la intención de dispensarse para una administración inmediata o para almacenamiento a corto plazo, pueden asignarse fechas de vencimiento en base a criterios diferentes a los empleados para productos elaborados en escala industrial. Cuando se asigna una fecha de vencimiento, los farmacéuticos deben consultar y aplicar la documentación general sobre estabilidad y la vinculada a la droga en particular. La fecha de vencimiento deberá asignarse siguiendo un criterio conservador. Como pautas generales y en ausencia de información sobre la estabilidad aplicable a la droga o a un preparado específico, se recomiendan las siguientes pautas:

- Para preparaciones sólidas o líquidas no acuosas y cuando una especialidad medicinal es la fuente del principio activo, la fecha de vencimiento no deberá exceder el 25% del tiempo remanente hasta la fecha de vencimiento de la especialidad, o de 6 meses; el tiempo que resulte más corto.
- Para preparaciones sólidas o líquidas no acuosas que se realicen a partir de materias primas individuales, la fecha de vencimiento no deberá exceder los 6 meses.

- Para preparaciones acuosas la fecha de vencimiento no deberá exceder los 14 días, conservadas en heladera.
- Para todas las otras preparaciones la fecha de vencimiento no deberá exceder el tiempo de duración de la terapia ó 30 días; el tiempo que resulte más corto.

La calidad de las formulaciones magistrales vendrá enmarcada en la adecuación de estas a una serie de propiedades cuantitativas y cualitativas tales como: peso, composición, aspecto, estabilidad, absorción y distribución en el organismo, etc. El control de calidad de preparaciones magistrales, se aplica de manera diferente a como se hace en la industria, en este caso se pone especial énfasis en asegurar la calidad de los pasos intermedios de elaboración, fundamentalmente en lo que se refiere a la idoneidad de las materias primas, al correcto seguimiento del protocolo de preparación y a la preparación realizada únicamente por el farmacéutico, lo cual constituye un verdadero respaldo para la calidad final.

No es menos cierto, sin embargo, que existen una serie de pruebas sencillas de realizar y que pueden facilitar una idea de la aceptabilidad o no del producto terminado.

En general podemos afirmar que la seguridad, calidad y rendimiento de los preparados farmacéuticos dependen del empleo de ingredientes y cálculos correctos, mediciones exactas y precisas, condiciones de formulación y procedimientos apropiados y del juicio prudente del farmacéutico. Como control final, el farmacéutico debe revisar cada procedimiento del proceso de elaboración del preparado farmacéutico. Para garantizar la exactitud y la integridad, el farmacéutico debe observar la preparación terminada para asegurarse de que parece ser el preparado esperado. Si hubiera alguna discrepancia deberá investigar el origen y tomar medidas correctivas apropiadas antes de que la prescripción se dispense al paciente.

Controles de calidad recomendados para preparados magistrales:

Se procederá, como mínimo, al examen detallado de los caracteres organolépticos y un control de la rotulación.

Sería sumamente deseable y a veces necesario, realizar el análisis cuantitativo del principio activo al menos cuando el margen terapéutico es estrecho. En una farmacia esto representa una verdadera dificultad, por lo que es preferible renunciar a elaborar preparaciones riesgosas si no se tienen los medios adecuados para determinar la cantidad de principio activo.

Es conveniente efectuar además los siguientes controles no destructivos o que requieran una pequeña cantidad adicional de preparado, para las diferentes formas farmacéuticas:

1. Cápsulas y otras formas sólidas vía oral:
   - *Uniformidad de peso*: pesar individualmente 20 unidades ó todas las elaboradas si el número es inferior a 20. Cada unidad controlada deberá tener un peso entre 90 – 110 % del peso teórico.
   - *Test de desintegración*: según Farmacopea Argentina.
   - *Revisión de caracteres externos*: cápsulas limpias, bien cerradas, con buen aspecto.
2. Preparados semisólidos de aplicación tópica:
   - *Homogeneidad:* extender una capa fina sobre una superficie negra, comprimir con una placa de vidrio y examinar con una lupa.
   - *pH:* realizar sobre una dispersión al 10% en agua
   - *Desviación de peso respecto al teórico:* peso de la fórmula terminada descontando el envase, una desviación alta sobre el valor teórico puede indicarnos un error de elaboración.
   - *En el caso de emulsiones confirmar su tipo (O/W ó W/O):* por dispersión de una pequeña cantidad en agua ó por colorantes. Si se utilizan colorantes de la serie Sudán y se colorea, estaremos ante una emulsión w/o; con azul de metileno si se produce coloración, la emulsión será o/w.
3. Soluciones y suspensiones orales y tópicas:
   - *Aspecto*: deberá observarse ausencia de partículas extrañas y transparencia en las soluciones.
   - *Hermeticidad del cierre*.

- *pH*: para preparados acuosos se tomará directamente, mientras que para los no acuosos se recomienda una dispersión al 10% en agua.

Las Farmacopeas

Las Farmacopeas constituyen las normas oficiales de calidad. Para el registro de Medicamentos ante los Organismos de Control, no solo es necesario aportar datos de seguridad y eficacia de las materias primas y los productos terminados sino que es imprescindible garantizar esas condiciones, estableciendo adecuados controles de calidad. En nuestro país este control de la calidad se debe realizar de acuerdo a las monografías correspondientes que figuran en la Farmacopea Argentina VII edición, de reciente actualización.

Las Farmacopeas son códigos oficiales que recogen los estándares de calidad de las materias primas farmacéuticas y de los medicamentos, que deben estar adaptados a la situación actual del conocimiento y a las posibilidades de la instrumentación analítica.

De un modo general la función de una Farmacopea es establecer los requisitos de calidad que los principios activos y los medicamentos deben obligatoriamente cumplir.

Para que un producto sea considerado de buena calidad deberá responder adecuadamente con una serie de estándares, como ser, identidad, pureza, potencia, biodisponibilidad y estabilidad, cada uno de ellos involucra ensayos específicos que el producto deberá cumplir.

En las farmacopeas encontramos: Monografías de principios activos y monografías de medicamentos, sin la dosis utilizada. En una monografía de un principio activo se incluye:

- Definición
- Sinonimia
- Caracteres generales
- Envasado y conservación
- Sustancias de Referencia

- Identificación
- Pérdida por secado o Determinación de agua
- Residuo de ignición
- Pureza cromatográfica o Sustancias relacionadas
- Otros ensayos: ensayos límites, impurezas orgánicas volátiles, rotación óptica, pH.
- Valoración

En una monografía de un medicamento se incluye

- Definición
- Envasado y conservación
- Sustancias de Referencia
- Identificación
- Disolución (según la forma farmacéutica)
- Uniformidad de unidades de dosificación
- Otros ensayos: pH (para formas farmacéuticas líquidas, polvos, cremas), endotoxinas bacterianas (para inyectables), esterilidad (para soluciones oftálmicas)
- Valoración

Preguntas Orientadoras

1. A qué se denomina “Fase crítica de un proceso”? Ejemplos.

2. Qué tipos de documentos deben llevarse en un Laboratorio productor para cumplir con las GMP?

3. Cómo define GLP?. Qué son los Procedimientos Normalizados de Trabajo, en qué casos se aplican y qué incluyen?

4. Con que finalidad se procede a la calibración de equipos de laboratorio como por ejemplo balanzas y espectrofotómetros?

5. Cuáles son las etapas en la calificación de un equipo que nos permitirá asegurar un funcionamiento coherente dentro de los límites establecidos?

6. En las preparaciones magistrales, que controles de calidad le realizaría a las cápsulas y a las soluciones?

Test de Autoevaluación

1. Uno de los principales objetivos de las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) es:
   (a) Disminuir los errores de trazabilidad de las Sustancias de Referencia
   (b) Disminuir los riesgos de confusión en los rótulos
   (c) Disminuir los errores de dispensación de los medicamentos
   (d) Aumentar la eficacia de un principio activo

2. Qué controles de calidad le realizaría a un preparado magistral, cuya forma farmacéutica es una crema?
   (a) Determinación del tiempo de disolución
   (b) Determinación del pH
   (c) Ensayo de uniformidad de contenido
   (d) Determinación de la viscosidad

3. Qué fecha de vencimiento asignaría a un preparado magistral elaborado a partir de una especialidad:
   (a) 1 año
   (b) La fecha de vencimiento de la especialidad
   (c) 50% de la fecha de vencimiento de la especialidad
   (d) 25% de la fecha de vencimiento de la especialidad

4. Qué ensayo de control de calidad le realizaría a cápsulas preparadas en una Farmacia Oficinal:
    (a) Ensayo de Disolución
    (b) Ensayo de Uniformidad de Unidades de Dosificación por peso
    (c) Determinación del pH
    (d) Ensayo de esterilidad

Bibliografía

1. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VII ed. (2003) Buenos Aires.

2. Aiache, J-M; Aiache, S.; Renoux, R. (1996) *Introducción al estudio del medicamento*. Barcelona: Masson.

3. Barbé Rocabert, C. (2001) *Preparados farmacéuticos y parafarmacéuticos*. Barcelona: Masson.

4. Colegio de Farmacéutico de Bizkaia. (1997) *Formulación magistral en atención primaria*. España.

5. Rodríguez de Ordaz, R. (1991) *Compendio de fórmulas magistrales y sus técnicas de manufactura.* Caracas: Compograf .

6. Llopis Clavijo, M.J.; Baixauli Comes, V. (1997) *La formulación magistral en la oficina de farmacia.* Valencia: Distribuciones Cid.

CAPITULO 2

EL MÉTODO ANALÍTICO EN EL CONTROL DE CALIDAD

María Guillermina Volonté

El concepto de Validación

En el capítulo anterior mencionamos que la validación es la parte de las GMP por la cual se logra que los sistemas, los equipos, los procesos y los procedimientos para los ensayos de calidad estén bajo control y, por consiguiente, se produzca uniformemente un producto de calidad.

La validación se define como el establecimiento de pruebas de laboratorio, debidamente documentadas, que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados, es decir, que dicho proceso será apropiado para el uso propuesto. Los estudios de validación son aplicables a los métodos analíticos no codificados en las Farmacopeas, a los equipos tanto de producción como analíticos, a las computadoras, programas y sistemas, así como a los servicios del establecimiento (por ejemplo aire, agua, vapor, etc.) y a los procesos (como el de fabricación, limpieza, esterilización, llenado estéril, liofilización, etc.). Se hará una validación para el liofilizador como equipo y otra para el proceso de liofilización; una para la limpieza del material de vidrio y otra para la limpieza del establecimiento; una para el proceso de esterilización y otra para las pruebas de esterilidad. Es preciso demostrar que cada paso del proceso de fabricación de un medicamento se efectúa según lo previsto.

Los objetivos de una validación son otorgar Confiabilidad, Seguridad y Efectividad al proceso que se está validando.

Y por qué se debe validar? Porque un sistema validado es un sistema estable, capaz y robusto y es así como nos interesa mantenerlo, dado que estas características son esenciales para mantener altos niveles de calidad

Los estudios de validación verifican el sistema en estudio y en condiciones de pruebas extremas (pruebas a las que se llaman habitualmente “peor caso”),

semejantes a las que cabría esperar durante el proceso, a fin de comprobar que dicho sistema está bajo control. Una vez que el sistema o proceso se ha validado, cabe prever que permanezca bajo control, siempre y cuando no se hagan cambios en el mismo. Si se producen modificaciones o surgen problemas, o si un equipo se sustituye o se cambia de ubicación, habrá que efectuar la revalidación. Los equipos y procesos de importancia crítica se revalidan en forma sistemática a intervalos adecuados a fin de demostrar que siguen bajo control.

El concepto de validación se aplicó por primera vez en la producción estéril. A raíz de varios graves incidentes ocurridos en Estados Unidos en 1968, en Inglaterra en 1972 y en Francia en 1977, donde murieron pacientes a los que se les habían administrado soluciones intravenosas contaminadas, se vio la necesidad de intensificar los controles a los procesos de esterilización y envasado aséptico. En el caso de Inglaterra la investigación mostró tres fallos no detectados: el autoclave no alcanzó en todo su volumen la temperatura de esterilización, por estar una válvula bloqueada; el operario hizo caso omiso del registro de temperatura (incorrecto) por ser correcto el de presiones y el test de esterilidad no detectó el fallo a pesar de estar contaminadas 1/3 de las unidades, ya que solo se muestreó de la parte superior de la carga.

Las validaciones pueden ser Retrospectivas cuando combinan nuevos criterios con la experiencia adquirida anteriormente o Prospectivas cuando se inicia desde un comienzo una validación. La Revalidación se realiza cuando procedimientos ó métodos ya validados han sufrido alguna modificación o cambios en la droga o en la composición del producto y por lo tanto se deben volver a validar.También se debe realizar cuando la matriz y/o la concentración de analito son distintos a los originalmente analizados.

Con la validación se consigue un aseguramiento de la calidad correcto, reducción de costos, aumento de la productividad, cumplimiento de las regulaciones y optimización de los procesos.

Las validaciones se deben llevar a cabo en plantas pilotos donde se elaboran nuevos productos, en plantas farmacéuticas, en plantas químicas que elaboran

drogas o excipientes, en plantas que elaboran productos de diagnóstico, en plantas de biotecnología y en laboratorios de control.

Cuándo se valida se debe realizar una planificación previa con todas las variables, elegiendo siempre el "peor caso". Se debe elaborar un Plan Maestro, protocolos de validación, un plan de muestreo extensivo, considerar el proceso propiamente dicho, un análisis físico químico y microbiológico intensivo y por último un informe final.

Para la planificación debe existir un comité de validación formado por expertos de las distintas disciplinas, quienes deberán elaborar un listado de prioridades.

El Plan Maestro es un programa que describe cómo se planifica y de que manera se hará el trabajo de validación antes de que el área, planta, operación o proceso pueda ser considerado para ser validado. El nivel de detalles varía con la magnitud del plan. El protocolo es un documento de investigación e imaginación. Describe paso a paso como será la validación antes de comenzar.

El plan de muestreo forma parte del protocolo. No es el plan de muestreo rutinario a utilizar durante una producción normal del producto. Respecto del número de muestras a evaluar, dependerá si estamos validando un proceso o un producto, habitualmente se utilizan tres lotes. Estadísticamente es un número pobre, pero aceptable. No se puede fabricar una cantidad mayor y elegir los tres mejores lotes o los tres que cumplieron. Se debe determinar previamente tres lotes consecutivos con sus números de lote a ser fabricados en el futuro para ser parte de la validación.

La producción deberá seguir los métodos de manufactura y la formula aprobados, pero con especial cuidados y detalles. Los análisis físico químicos y microbiológicos son la parte más delicada, la que más puede ser influida por errores humanos, de equipos no validados, etc. En el informe final se incluirán los resultados analíticos de las muestras durante el proceso y del producto terminado o del método validado y un dictamen final.

Antes de iniciar una validación se debe verificar que las instalaciones donde se realizará la misma sean adecuadas, al igual que los Procedimientos Operativos que se van a utilizar, que los equipos estén calificados, que los materiales y reactivos sean los adecuados, que las sustancias de referencia con las cuales

se hará la validación sean trazeables y que el personal a cargo de la validación esté capacitado y entrenado.

El Método Analítico

El empleo de métodos analíticos se inicia en la etapa de investigación y desarrollo de un medicamento, para luego aplicarse en las diferentes fases de su fabricación, así como en estudios posteriores tales como los de bioequivalencia, analizando el fármaco en fluidos biológicos, para establecer condiciones de intercambiabilidad. En cada uno de los casos la metodología analítica deberá ajustarse a los requerimientos necesarios para cumplir con la finalidad específica de la mencionada etapa.

Con la aplicación de métodos analíticos podremos dar respuesta a diversos interrogantes que debemos afrontar cuando a calidad de un medicamento nos referimos. Entre otros, los principales son:

La identidad y la pureza del principio activo y de los excipientes empleados en la formulación, ¿cumplen con las especificaciones farmacopeicas?

Cuál es el contenido de principio activo en la formulación? Cumple con lo que declara?

Cuál es su estabilidad y cuál su fecha de vencimiento?

A qué velocidad se libera el activo desde la forma farmacéutica, para luego absorberse?

Cuál es la concentración del fármaco en un fluido biológico, después de administrar una dosis de medicamento?

La elección del método analítico adecuado para responder a cada una de estas preguntas, será determinante para la veracidad de los resultados obtenidos, ya que no siempre el mismo método analítico será válido para obtener la respuesta correcta, quizás el método seleccionado para evaluar la pureza de la materia prima del principio activo, no sea el óptimo para controlar el contenido del mismo en la formulación o para establecer su estabilidad en dicha formulación. En las Farmacopeas podremos encontrar las especificaciones de

los métodos a utilizar en cada uno de estos casos, así como la instrumentación más idónea, las cuales habitualmente requieren de la utilización de sustancias de referencia apropiadas, de calidad garantizada, tanto para calibrar los equipos utilizados, como para llegar a un resultado cuantitativo con el método de análisis propuesto.

En todos los casos los métodos analíticos que se utilicen deberán estar siempre validados, como cualquier otro proceso utilizado en la fabricación industrial de medicamentos, tal como ya hemos señalado.

Validación del método analítico

Por validación analítica se entiende el trabajo experimental encaminado a obtener pruebas documentadas de que un método proporciona fehacientemente la información requerida al uso al que se destina. En otras palabras la validación nos otorga la confianza necesaria para aplicar el método y a su vez confiar en los resultados obtenidos: un método analítico validado es un método analítico confiable.

Las Buenas Prácticas de Fabricación y Control (GMP) requieren que los métodos analíticos empleados para evaluar las especificaciones establecidas sean apropiados.

La validación de un método es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio, que un método es adecuado para el uso propuesto.

Aspectos regulatorios de la validación

- A nivel Nacional:
    - Farmacopea Argentina (FA) VII ed. <1130> Validación de Métodos analíticos.
    - Disposiciones de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) 1930/92, 853/99, 2819/04.

- A nivel Internacional:
    - USP 34 <1225> Validation of Compendials methods.
    - International Conference on Harmonisation of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (Japón, Estados Unidos y la Comunidad Europea), Guidelines Q2A y Q2B.

Qué debe validarse?

Deben validarse métodos analíticos de:

- Materias Primas.
- Control de Procesos.
- Control de Productos Intermedios.
- Control de Productos Terminados.
- Estudios de Estabilidad.
- Validaciones de Limpieza.

Todos los métodos no codificados en Farmacopeas reconocidas deben ser validados; los métodos codificados en Farmacopeas sólo deben validarse cuando son destinados a estudios de Estabilidad y para Validación de Limpieza.

Parámetros a evaluar

- Especificidad.
- Linealidad y Rango.
- Exactitud.
- Precisión
    - Repetibilidad
    - Precisión Intermedia

- Reproducibilidad
- Sensibilidad
  - Límite de Detección (LD)
  - Límite de Cuantificación (LC)
- Robustez.

Cada uno de estos Parámetros se determina utilizando un estándar del analito ó Sustancia de Referencia.

En qué casos evaluar cada parámetro?

Los métodos analíticos se clasifican en 4 categorías:

- **CATEGORÍA I**: Incluye los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los principios activos (incluyendo los conservantes) en productos farmacéuticos.

- **CATEGORÍA II**: Incluye los métodos analíticos empleados para la determinación de impurezas en las materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos límites.

- **CATEGORÍA III**: Incluye métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (como por ejemplo, disolución, liberación de principios activos).

- **CATEGORÍA IV**: Incluye ensayos de identificación.

Para cada categoría de análisis, se necesita diferente información analítica. En la tabla a continuación, se indican los elementos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

	CATEGORÍA DEL MÉTODO				
	I	II (Cuant.)	II (Lím.)	III	IV
Especificidad	+	+	+	(*)	+
Linealidad	+	+	(*)	(*)	(*)
Exactitud	+	+	(*)	(*)	(*)
Precisión	+	+	(*)	+	(*)
LD	(*)	(*)	+	(*)	+
LC	(*)	+	(*)	(*)	(*)
Robustez	+	+	+	+	+
Intervalo	+	+	(*)	(*)	(*)

(*) Puede requerirse según la naturaleza del ensayo.

A continuación se definen cada uno de los atributos necesarios para validar un método analítico junto con una breve descripción de cómo deben determinarse. Cada uno de los parámetros se determinan utilizando Sustancia de Referencia o estándar del analito (SR)

Especificidad

Definición

La especificidad de un método implica su capacidad para evaluar al analito en presencia de otros componentes que pueden estar presentes, tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, productos laterales de síntesis, componentes endógenos o metabolitos del mismo analito en un fluído biológico, excipientes, etc. En otras palabras, se deberá corroborar que la matriz que rodea al analito, no influya en los resultados obtenidos al aplicar el método.

Determinación

a) Si se dispone de dichos componentes.

- ***En el caso de análisis cualitativo*** (ensayos de identificación) debe demostrarse la capacidad de discriminar entre sustancias de estructuras

estrechamente relacionadas que pudieran estar presentes. La discriminación del método se determina aplicando el mismo a una muestra conteniendo SR y los otros componentes y a una muestra que no contenga SR (blanco).

- ***En el caso del análisis de impurezas***, la especificidad puede establecerse por el agregado de cantidades apropiadas de impurezas a la SR o al producto farmacéutico y demostrando que estas impurezas son determinadas con la precisión y exactitud necesarias.

- ***En el caso de una valoración***, se debe demostrar que el método no se ve afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede realizarse agregando, a la SR, cantidades apropiadas de impurezas o excipientes y/o al producto farmacéutico, cantidades apropiadas de impurezas, demostrando que el resultado de la valoración no se ve afectado por la presencia de estos materiales extraños.

b) Si no se dispone de dichos componentes (productos de degradación o impurezas).

- La especificidad puede ser demostrada por comparación de los resultados del ensayo con muestras que contienen impurezas o productos de degradación a través de un segundo método independiente (como por ejemplo, métodos farmacopeicos u otro método analítico validado). Estas comparaciones deberían incluir muestras almacenadas bajo condiciones exigentes de calor, humedad, hidrólisis ácido-base y oxidación. En el caso de valoraciones los dos resultados deberían compararse. En el caso de ensayos cromatográficos para impurezas deberían compararse los perfiles cromatográficos.

- Otra forma sería generar productos de descomposición mediante degradaciones forzadas parciales (no mayor a un 20%):

Fotólisis
Hidrólisis
Hidrólisis ácida (HCl 1N)
Hidrólisis alcalina (NaOH 1N)
Oxidación (H_2O_2)
Reducción
Calor

Por ejemplo: en HPLC evaluar pureza de pico (MS-HPLC, arreglo de diodos, relación a dos λ o degradación enzimática específica).
Para determinar si algún producto de descomposición produce un pico superpuesto al del analito y que no se alcance a evidenciarlo.
Conviene complementar este estudio con un método alternativo TLC o GC, y comparar los resultados (n^0 y % de los componentes de la muestra degradada)

Criterios de aceptación

No deben observarse interferencias entre las señales de los excipientes, impurezas de síntesis y/o productos de degradación y la señal o respuesta (por ejemplo: absorbancia, área o altura de pico, etc.) del compuesto de interés.

Linealidad e Intervalo

Definición

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito, dentro de un intervalo de concentración. En algunos casos puede ser necesaria la aplicación de transformaciones matemáticas para obtener una recta.

El intervalo se refiere al rango de concentraciones de analito que pueden ser determinadas con precisión y exactitud. Normalmente se expresa con las mismas unidades que los resultados del ensayo.

Determinación

La linealidad debe establecerse a lo largo del intervalo de concentraciones del método analítico. Se debe establecer por medio de un método estadístico adecuado (por ejemplo regresión por cuadrados mínimos). Deben informarse el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2) la ordenada al origen (a) y la pendiente (b) de la recta de regresión.

Para establecer la linealidad se debe ensayar un mínimo de cinco concentraciones con tres réplicas de cada uno y tres determinaciones de cada réplica.

Se recomienda considerar los siguientes intervalos:

- Para la Valoración de una sustancia (o producto farmacéutico): 80-120% de la concentración de ensayo.
- Para la determinación de Impurezas: LC (límite de cuantificación)-120% de la especificación.
- Para la determinación de Uniformidad de contenido: 70-130% de la concentración del ensayo a menos que se justifique otro intervalo de acuerdo a la naturaleza de la forma farmacéutica.
- Para ensayos de Disolución: $\pm$ 20% del intervalo especificado.
- Para estudios de estabilidad: 40-120% de la concentración de ensayo.

Con los resultados obtenidos se evalúa la linealidad por el método de regresión de los cuadrados mínimos, de tal manera de obtener la ecuación de una recta: y = a + bx

$$a = \frac{\sum y_i - b\sum x_i}{n}$$

La ordenada (**a)** evalúa la proporcionalidad entre la señal y la concentración (si hay errores aleatorios, la recta no pasa por cero)

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

La pendiente (**b**) evalúa la sensibilidad del método.

$$r = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sqrt{\left((\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n})(\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}\right)}}$$

El coeficiente de regresión lineal (r) mide el ajuste al modelo lineal.

El valor r=1 indica una recta perfectamente lineal; un valor r=0 indica la no correlación entre x e y. Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico de Student (*t*), en el cual se calcula un valor de t_r para (n-2) grados de libertad y se compara con el valor *t* tabulado para el nivel de confianza requerido.

En este caso, la Hipótesis Nula (H_0) es la no correlación entre x e y. Si el valor observado de t_r es mayor que *t* de tabla, se rechaza la hipótesis nula, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Donde r^2 = coeficiente de determinación
n = número de determinaciones independientes

Los límites de confianza del estimador de la pendiente (b) y la ordenada al origen (a) se
calculan en función de sus varianzas.

$$S_a = \sqrt{S_b^2 \frac{\sum x_i^2}{n}}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{Sxy^2}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}}$$

$$Sxy^2 = \frac{\sum y_i^2 - a\sum y_i - b\sum x_i y_i}{n-2}$$

Luego los intervalos de confianza serán: $[b \pm t\, S_b]$; $[a \pm t\, S_a]$

Siendo *t* el que figura en tabla de Student para cierto nivel de confianza, generalmente 0,05 y (n-2) grados de libertad.

Criterios de aceptación

- Coeficiente de correlación:
  - para Macrocomponentes, $r \geq 0{,}99$ y $r^2 \geq 0{,}98$
  - para Impurezas, $r \geq 0{,}98$.
- Intervalo de confianza de la ordenada al origen: debe incluir al cero.

Exactitud

Definición

La exactitud, interpreta los errores sistemáticos o tendencia de un método analítico, expresa la proximidad entre el resultado obtenido y "el valor verdadero". Debe establecerse en todo el rango especificado para el método analítico.

Matemáticamente suele expresarse de los siguientes modos:

- Error absoluto $= \bar{X} - \hat{X}$
- Error relativo $\% = \dfrac{(\bar{X} - \hat{X}) \times 100}{\hat{X}}$
- Recuperación $= \dfrac{\bar{X} \times 100}{\hat{X}}$

$\bar{X}$: valor medio experimental

$\hat{X}$: valor verdadero

Los errores deben ser tan pequeños como sea posible para que el valor medio experimental se aproxime al de referencia o verdadero, si no fuera así y según su significancia los aceptaremos o reformularemos el protocolo de aplicación del método, para minimizarlos o adaptarlos a los requerimientos exigidos para cada método analítico, en lo que a errores se refiere.

Dicho de otro modo, la recuperación debe acercarse al 100%, En todos los casos, la exactitud debe evaluarse mediante el diseño que emplea un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración que cubran el intervalo especificado para linealidad, por ejemplo tres concentraciones al 80, 100 y 120% del valor esperado, al que se le agregan los excipientes del producto (Ensayo de Recuperación), con tres repeticiones completas del método para cada una de las concentraciones. Puede utilizarse un test *t* de Student, efectuando varias determinaciones de la muestra de concentración conocida y calculando el *t* experimental, t_{ob} , que se compara con el *t* de tabla para (n-1) grados de libertad en el nivel de confianza escogido, generalmente p = 0,05.

[H_0: no hay error sistemático]

$$t_{ob} = \frac{\left|\hat{X} - \overline{X}\right|}{\frac{S}{\sqrt{n}}}$$

$$t_{ob} = \frac{\left|100 - R\right|}{\frac{CV}{\sqrt{n}}}$$

Si $t_{ob} < t$ de tabla, no existen diferencias significativas entre recuperación media y 100 % y por lo tanto el método tiene la exactitud requerida para ese ámbito de confianza.

Si $t_{ob} > t$ de tabla, el método tiene un error sistemático para ese ámbito de confianza.

S: desviación estándar,

n: número de determinaciones independientes.

R: recuperación porcentual promedio de todas las concentraciones.

CV: coeficiente de variación.

Por otra parte, resulta conveniente graficar en todos los casos descriptos a continuación, masa hallada vs. masa agregada, rectificando por el método de los cuadrados mínimos. En este caso r ≥ 0.99, la pendiente deberá ser cercana a 1 o el Intervalo de confianza de la pendiente incluir al 1 y la ordenada al origen deberá ser próxima a 0 o el intervalo de confianza de la ordenada incluir al 0. Si la pendiente fuera significativamente distinta de 1 indica un error proporcional (por ejemplo, debida a la extracción de un porcentaje constante del componente). Una ordenada al origen significativamente diferente a cero indica un error de tendencia constante y se visualiza como una recta paralela a

la teórica, en la cual el valor de la ordenada al origen corresponde a la magnitud del error.

Si no es posible obtener muestras de todos los componentes del producto, puede ser aceptable agregar cantidades conocidas del analito al producto (Método del Estándar Agregado) o comparar los resultados obtenidos con un segundo método cuya exactitud haya sido establecida.

$$\% \, Recuperación = \frac{(Cm+s-Cm)\times 100}{Cs}$$

Cm: concentración de la muestra o producto sin agregado de SR.
Cm+s: concentración de muestra + SR.
Cs: concentración de SR

Precisión

Definición

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. Está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central. La precisión de un método analítico generalmente se expresa como la desviación estándar (σ), estimada analíticamente por S o más comúnmente con la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).

El estimador S de la desviación estándar se calcula como:

$$S = \sqrt{\frac{\sum\left(x_i - \bar{x}\right)^2}{n-1}}$$

siendo $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$, el estimador de la media poblacional

$$CV = \frac{S \times 100}{\bar{X}}$$

Ambos estimadores, desviación estándar y CV permiten evaluar los errores aleatorios en la estimación de la medida correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media.

La precisión puede ser considerada en tres niveles:

- **Repetibilidad o Precisión Intra-ensayo**: expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto (mismo analista, mismo día, mismo equipo y condiciones).
- **Precisión intermedia o Precisión Inter-día**: expresa las variaciones intralaboratorio, es decir, distintas condiciones en distintos días, dentro del mismo laboratorio (diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.)
- **Reproducibilidad o Fortaleza**: expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos)

Determinación

La precisión de un método analítico debe estudiarse sobre:

- El **sistema**: se calcula como el coeficiente de variación (CV%) de 6 determinaciones de una misma solución del Estándar del Principio activo, al 100% o de 9 determinaciones (3 a tres concentraciones)
- El **método**: se calcula como el CV% de 6 muestras de una misma concentración (al 100% o 9 a 3 concentraciones). La evaluación corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito por parte del instrumento.

Criterio de Aceptación: CV ≤ 2%

Sensibilidad: Límite de Detección (LD) Límite de Cuantificación (LC)

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Un método es sensible cuando frente a una pequeña variación en la concentración se obtiene una significativa variación en la señal.

Se debe diferenciar claramente entre dos tipos de sensibilidad:

- **Sensibilidad de calibración**, correspondiente a la pendiente de la curva de calibración.
- **Sensibilidad analítica**, correspondiente al cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar de la medida.

Resulta claro que dos técnicas o la misma técnica empleada para diferentes matrices, pueden tener la misma sensibilidad de calibración, pero diferente sensibilidad analítica debida a factores propios como necesidad de extracción, concentración, etc.

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y de cuantificación.

Definiciones

El *límite de detección* es la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas.

El *límite de cuantificación* es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas.

Determinación

Existen diversas maneras para determinar el límite de detección, dependiendo de si se trata de un método no instrumental o instrumental.

- **Para métodos no instrumentales**: ambos límites se determinan por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado en forma confiable (LD) y el mínimo nivel al cual puede ser cuantificado con precisión y exactitud (LC). Se los suelen llamar Métodos de los Falsos Negativos.
- **Para métodos instrumentales** que exhiben ruido de fondo. Para el *límite de detección* puede efectuarse por comparación con la respuesta de un blanco o placebo, siendo positiva cuando la señal del analito supere la relación señal/ ruido en un factor de 2 o 3. Para el *límite de cuantificación* se mide la señal de fondo (relación señal/ ruido); efectuando mediciones repetidas sobre un blanco o placebo, se mide su desviación estándar y se

calcula el límite de cuantificación multiplicando esa desviación por un factor, generalmente 10. El valor resultante se valida por análisis de un número variable de muestras de concentración cercana al límite fijado.

Dado que la determinación de los límites de detección y de cuantificación supone un trabajo importante, en general sólo se efectúa para el análisis de impurezas o trazas o cuando el rango analítico se encuentra muy próximo al límite de detección. En caso contrario, sólo se estudia la precisión y la exactitud en la menor concentración probable para el analito.

Ambos límites también pueden estimarse a partir de la curva de regresión, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a cero:

1. Se determina la pendiente (**b**) de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado.
2. Se obtiene otra curva de calibración, cada punto por triplicado, pero en este caso para concentraciones menores de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: $\mathbf{Y_{bl}}$.
3. Se determina la desviación estándar (s) correspondiente a cada concentración del punto 2, se calcula la recta correspondiente a concentración vs s y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado $\mathbf{S_{bl}}$ correspondiente a la desviación estándar del blanco.
4. Se calculan ambos límites para **n’** medidas individuales como:

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b\sqrt{n'}} \qquad LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b\sqrt{n'}}$$

Cualquiera sea el método empleado, el LD y LC debe ser confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones similares a los límites hallados.

Robustez

Definición

La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad de no verse afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad. Ejemplos de variaciones que deben estudiarse durante la evaluación de la robustez son:

- diferentes instrumentos,
- diferentes lotes de reactivos,
- diferentes tiempos de valoración,
- diferentes temperaturas,
- diferentes columnas cromatográficas (distintos lotes o proveedores).

La robustez se expresa como la falta de influencia de las variables operativas y del entorno sobre los resultados del ensayo y dará confianza al método en su aplicación frente a cambios imprevistos en los equipos utilizados, en los analistas encargados de aplicarlo o en otros parámetros que se puedan alterar durante la utilización del mismo.

Determinación

Se determina mediante el análisis de alícuotas a partir de lotes homogéneos empleando condiciones operativas diferentes pero que están dentro de los parámetros específicos en la valoración. El grado de reproducibilidad de los resultados del ensayo se compara con la precisión de la valoración bajo condiciones normales para obtener una medida de la robustez del método analítico.

Valoraciones respetando el diseño habitual:
Mínimo 3 niveles que incluyan a todo el intervalo (80%- 100%- 120%)
Si quisiera modificar todas las variables en cada uno de los ensayos, tendría que realizar numerosos ensayos.

A fin de organizar y disminuir el número de ensayos, se puede diseñar el estudio utilizando una Matriz de Placket-Burman (Diseño de Experimento Multifactorial) donde para (n) variables se realizan (n+1) ensayos.

Diseño de Placket-Burman:

Variables	**Número de ensayo**							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
A	a	a	a	a	A	A	A	A
B	b	b	B	B	b	b	B	B
C	c	C	c	C	c	C	c	C
D	d	d	D	D	D	D	d	d
E	E	e	E	e	e	E	e	E
F	F	f	f	F	F	f	f	F
G	G	g	g	G	g	G	G	g
% SVD	s	t	u	v	w	x	y	z

Ensayos: 1,2…8 Variables: A,B…G Parámetros: s,t…z

Para cada variable elijo 2 niveles: por ejemplo (**A)** extremo o alto y (**a)** Nominal o bajo.

Hallar para cada variable evaluada la DP: diferencia promedio:

DP = (Promedio de las valoraciones obtenidas a altos niveles) – (Promedio de las valoraciones obtenidas a bajos niveles).

El criterio de aceptación según este diseño es:

Para cada variable evaluada: $|DP| < SD\ \sqrt{2}$ (No hay Diferencias Significativas)

(Donde SD: desviación estándar obtenida en el ensayo de repetibilidad)

Ventaja: en un diseño normal de "una variable por vez", el estudio de 5 variables resultaría en $2^5 = 32$ ensayos, en cambio siguiendo este diseño serían solamente 6 ensayos.

Cálculo de las DP de respuesta para cada parámetro:

Parámetros	Diferencia (DP)
A – a	DP_A = ¼ (w+x+y+z) - ¼ (s+t+u+v)
B – b	DP_B = ¼ (u+v+y+z) - ¼ (s+t+w+y)
C – c	DP_C = ¼ (t+v+x+z) - ¼ (s+u+w+y)
D – d	DP_D = ¼ (u+v+w+x) - ¼ (s+t+y+z)
E – e	DP_E = ¼ (s+u+x+z) - ¼ (t+v+w+y)
F – f	DP_F = ¼ (s+v+w+z) - ¼ (t+u+x+y)
G - g	DP_G = ¼ (s+v+x+y) - ¼ (t+u+w+z)

Recordar: La validez de un método analítico puede comprobarse sólo mediante estudios de laboratorio. En consecuencia, la documentación que avale tales estudios es un requisito básico para determinar si un método es apropiado para una aplicación determinada. Cualquier método analítico propuesto debe estar acompañado de la documentación necesaria.

Aptitud del Sistema (Test de Adecuabilidad o System Suitability Test)

Es una herramienta cuya aplicación permitirá verificar que determinados parámetros instrumentales se mantienen bajo control, confirmando que nuestro sistema en particular, brindará resultados dentro de los límites especificados, es útil ya que son habituales las variaciones en la estabilidad de los reactivos, equipos y analistas, por ejemplo en HPLC la variación del pH de la FM, diferentes lotes de columnas, la temperatura, el flujo, etc.

Los parámetros del Test de Adecuabilidad se deben establecer para cada tipo de método en particular. Su principal aplicación es en métodos cromatográficos. Se emplea para comprobar que la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico por HPLC son aptas para realizar el ensayo. Los parámetros de aptitud del sistema se determinan para el pico de la sustancia, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. Si es necesario, pueden realizarse ajustes en las condiciones operativas para cumplir con los requisitos de aptitud del sistema, entre ellos,

las proporciones de los componentes de la fase móvil y el caudal. La resolución *R* es una función de la eficiencia de la columna y se especifica para asegurar que las sustancias que eluyan muy cercanas se resuelvan entre sí y para asegurar que los estándares internos se resuelvan de las sustancias a ensayar. La eficiencia de la columna, determinando el Número de Platos Teóricos (N), puede especificarse también como requisito de aptitud del sistema, especialmente si hay solo un pico de interés en el cromatograma, sin embargo, el valor aislado de eficiencia no puede asegurar la resolución para el sistema en estudio. La eficiencia de la columna es una medida de la agudeza de los picos, importante para detectar componentes en baja concentración. Para evaluar si se cumplen los requisitos de aptitud del sistema se realizan inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* empleada en la *Valoración* u otra *Solución estándar.* A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, para calcular la desviación estándar relativa (RSD) o Coeficiente de Variación (CV), se emplean los datos de cinco inyecciones repetidas del estándar si el requisito es 2,0% o menor, y seis inyecciones repetidas si el requisito de la desviación estándar relativa es mayor de 2,0% .

El factor de asimetría (As) o tailing, una medida de la simetría del pico, es 1 para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta a medida que la asimetría es más pronunciada. En algunos casos, pueden observarse valores menores de la unidad. Como consecuencia de la asimetría del pico, la integración y la precisión se tornan menos confiables.

$As = \frac{W_{0,05}}{2\ f}$; en el cual $W_{0,05}$ es el ancho del pico al 5% de altura y f es la distancia entre el borde simétrico del pico y el centro del mismo medida al 5% de la altura.

Estos datos se obtienen a partir de inyecciones repetidas del estándar u otras soluciones según se especifique en la monografía correspondiente.

Métodos para evaluar resultados anómalos

Es sabido que determinaciones repetidas aplicadas sobre una misma muestra no siempre dan resultados concordantes. Para evaluar si estos resultados son anómalos y se los puede rechazar se recurre a diversos test estadísticos como por ejemplo:

- Test de Dixon
- Test de Grubbs

En ambos con la observación sospechosa se calcula un estadístico de prueba, el cual se compara con un valor límite basado en la suposición de un comportamiento aleatorio de los datos.

En el test de Dixon si el valor del estadístico supera el tabulado para una determinada probabilidad, se considera que es poco probable que ese dato se obtenga de un muestreo aleatorio de la población de resultados posibles y por lo tanto se lo considera anómalo.

El test de Grubbs es a la inversa.

Test de Dixon

Aplicado cuando tenemos un solo dato sospechoso.

Se procede de la siguiente manera:

1. Se ordenan los datos obtenidos en forma creciente
2. Si el dato sospechoso es el mayor (X_n), se calcula un estadístico Q:

$Q = (X_n – X_{(n-1)})/(X_n – X_1)$

3. Si el dato sospechoso es el menor (X_1):

$Q = (X_2 – X_1)/(X_n – X_1)$

4. Se compara el valor de Q con el valor crítico para (n) grados de libertad
5. Si el valor obtenido es mayor que el crítico se concluye que el dato es anómalo

Test de Grubbs

Aplicado cuando tenemos dos datos sospechosos. Se aplica de la siguiente manera:

1. Se ordenan los datos obtenidos en forma creciente
2. Se calcula la varianza de los mismos eliminando los 2 datos sospechosos
3. Se calcula la varianza para todos los datos
4. Se obtiene el cociente entre ambas varianzas
5. Se compara el valor obtenido con el de tabla para (n) grados de libertad.
6. En este caso como, es un test por disminución, si el valor obtenido es menor que el crítico se concluye que los 2 datos son anómalos

Resumiendo:

- La Validación de un Método Analítico debe ser verificada únicamente por estudios de laboratorio.
- Debe estar adecuadamente documentada.
- Cada parámetro de validación debe determinarse con un Estándar o Sustancia de Referencia.
- La exigencia de uno u otro parámetro dependerá del uso del método, es decir, del destino del método.
- Los métodos Farmacopeicos no deben ser validados, excepto los destinados a Estudios de Estabilidad o Validación de Limpieza.
- Únicamente se les aplicará el Test de Aptitud del Sistema (Test de Adecuabilidad)
- Los métodos se deben Revalidar cuando se introduce algún cambio en el mismo o cuando la matriz y/o la concentración del analito en un producto se ha modificado.

Preguntas Orientadoras

1. Qué métodos analíticos se incluyen en la Categoría II de las Farmacopeas?
2. Si Ud. deseara estudiar la robustez de un método, ¿cómo diseñaría el estudio? Indique qué variables y qué niveles de cada una de ellas elegiría, y la forma general de realizar el ensayo.
3. Describa los métodos que Ud. conoce para evaluar la selectividad de un método analítico.
4. Cuál es la Hipótesis Nula (H_0) al aplicar el Test de Student para evaluar Exactitud?

Test de Autoevaluación

1. En la validación de un método analítico destinado al control de una especialidad, qué parámetro debe determinar para evaluar errores inherentes al mismo:
   (a) Selectividad
   (b) Límite de cuantificación
   (c) Exactitud
   (d) Linealidad

2. En la validación de un método analítico, qué parámetro debe determinar para evaluar si el método es reproducible:
   (a) Selectividad
   (b) Límite de cuantificación
   (c) Exactitud
   (d) Precisión

3. Qué parámetro debe determinar para evaluar que los excipientes no interfieren:
   (a) Especificidad

(b) Límite de cuantificación
(c) Exactitud
(d) Linealidad

4. Cómo se expresa la Exactitud?
   (a) Desviación estándar
   (b) Error relativo
   (c) Pendiente de la curva de calibración
   (d) Intervalo de confianza

5. La Fortaleza de un método analítico expresa:
   (a) Precisión del Sistema
   (b) Robustez
   (c) Reproducibilidad
   (d) Datos no anómalos

6. La ordenada al origen de una curva de calibración evalúa:
   (a) La dispersión del método
   (b) La sensibilidad del método
   (c) La presencia de errores aleatorios
   (d) La presencia de productos de degradación

Bibliografía

1. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VII ed. (2003) Buenos Aires.
2. International Conference on Harmonisation (ICH) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methology* (2005) Silver Spring.
3. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 34) (2011) Rockville.
4. Quattrocchi, O.; Abelaira de Andrizzi, S. I.; Laba, R.F. (1992) *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica.* Buenos Aires: Artes Gráficas Farro

CAPITULO 3

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

Pablo Quiroga

Introducción

Las técnicas de separación cromatográficas, son métodos de separación de múltiples etapas en los que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil.

La cromatografía en capa fina, es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para la separación, identificación y determinación de pureza de drogas en su estado puro, o formando parte de una especialidad medicinal, drogas vegetales, fitoterápicos y/o muestras biológicas. Es una técnica analítica de elección por su simplicidad, confiabilidad, bajo costo y versatilidad en la detección de sustancias, a través del uso de diversos procedimientos de localización.

La cromatografía en capa fina (TLC), es una forma de cromatografía de adsorción en la cual la fase móvil se mueve por capilaridad a través de la fase estacionaria (adsorbente) aplicada como una capa fina y uniforme sobre un soporte inerte (vidrio, plástico, lámina de aluminio). La TLC puede ser considerada como una cromatografía de lecho abierto, y el mecanismo de separación se basa generalmente en un proceso de adsorción, sin embargo, es factible que ocurra un proceso de partición o a una combinación de ambos efectos, dependiendo del tipo particular de adsorbente, su preparación y el uso con diferentes fases móviles. Si por ejemplo la fase móvil contiene agua, metanol, u otro solvente muy polar, este líquido puede ser adsorbido desde la fase móvil que está avanzando, convirtiendo así el sistema de adsorción en un sistema cromatográfico de partición.

Cuando una mezcla de drogas se siembra sobre la placa y se desarrolla el cromatograma, cada sustancia correrá distancias diferentes a través de la placa dependiendo de afinidad por cada una de las fases (determinada por su

polaridad), sus valores de pKa, su capacidad de formar uniones de hidrógeno, etc.

Parámetros básicos en Cromatografía en capa fina - R_f y R_x

Los parámetros cromatográficos utilizados en TLC son R_f (Relación de Frente) y R_x. R_f es la relación entre la distancia recorrida por la sustancia y la distancia recorrida por el frente de la fase móvil, ambas medidas desde el punto de siembra (aproximadamente a 2 cm. del extremo inferior de la placa) al centro de la mancha si esta es redonda o al centro del área de más intensidad si la mancha tiene cola. R_x se calcula como el cociente entre la distancia recorrida por la sustancia y la distancia recorrida por la sustancia de referencia eluida bajo condiciones idénticas, ambas distancias medidas de la misma manera que las distancias para calcular el R_f.

Los valores de R_f pueden estar comprendidos entre 0 y 1, mientras que los valores de R_x pueden ser mayores que 1.

R_f varía con las condiciones experimentales. Los factores que afectan la reproducibilidad de R_f son:

Fase estacionaria: calidad del adsorbente, espesor de la capa, activación de la placa, distribución y tamaño de las partículas.

Fase móvil: calidad y pureza de los solventes. Debe prepararse para cada corrida debido a que los solventes pueden ser volátiles o higroscópicos.

Cámara de desarrollo: saturación de la misma (mínimo 30 minutos antes de la corrida).

Temperatura: la cámara de desarrollo no debe colocarse cerca de fuentes de calor, ni luz solar directa, ya que un aumento de temperatura aumenta la volatilidad de solventes, y R_f decrece ligeramente

Cantidad de siembra: aumentar la cantidad de masa sembrada frecuentemente produce un incremento de los valores de R_f especialmente por efecto de la cola de las manchas.

Para mejorar la reproducibilidad del Rf, es necesario cromatografiar en la misma placa la muestra problema y la sustancia de referencia.

Aplicaciones de la TLC

En el Análisis Farmacéutico, se utiliza habitualmente para *identificación* de principios activos y determinación de *pureza cromatográfica* de los mismos Bajo condiciones controladas puede ser empleada como *técnica de cuantificación.*

*Criterio de Identidad***.** Consiste en cromatografiar simultáneamente la sustancia desconocida, la sustancia de referencia y una mezcla de cantidades aproximadamente iguales de ambas. De cada muestra deberá sembrarse aproximadamente la misma cantidad de material a cromatografiar. Si la sustancia desconocida y la referencia corren distancias iguales (igual Rf), si Rx = 1 y si la mezcla de ambas se comporta como una sola sustancia (mancha única) puede presumirse que se trata de la misma sustancia, presunción que puede reforzarse si se ensaya en 3 o 4 condiciones cromatográficas distintas y los resultados son coincidentes. Muchos compuestos isoméricos no logran separarse. Por lo general se combina alguna prueba no cromatográfica (tal como historia de la muestra, UV, IR, reacciones coloreadas, etc.) con los datos de TLC para establecer la prueba de identidad.

Criterio de pureza. Una sustancia es *cromatográficamente pura*, cuando al ser sometida a distintas condiciones cromatográficas se comporta en todos los casos como una única sustancia (única mancha). Aunque nunca es posible demostrar que un producto es puro, es posible afirmar que no contiene determinadas impurezas o si las hay están en cantidades menores a los límites detectables. Por ejemplo, el ácido acetil salicílico (AAS) y el ácido salicílico (AS) pueden separase por TLC. Si una muestra de AAS se cromatografía con la aparición de una mancha única correspondiente al valor de Rf del AAS, entonces puede decirse que el AS, si lo hay en la muestra, es en cantidad menor que el límite de detección del método para AS.

Ensayo de Pureza cromatográfica / Sustancias relacionadas. Estos ensayos están codificados como: Ensayo de Pureza Cromatográfica en la Farmacopea de Estados Unidos (USP) y como Ensayo de Sustancias Relacionadas en Farmacopea Europea (EP) y Británica (BP), en diferentes monografías. Los mismos consisten en determinar que las impurezas que puedan acompañar a una determinada materia prima, no superen los límites codificados o preestablecidos; por debajo de estos límites se puede garantizar que la muestra cumple con los ensayos de calidad. Una impureza es un componente de la droga o de un producto terminado (excluyendo el agua) que no es la entidad química definida como la droga. Pueden ser por ej. subproductos de síntesis, productos de degradación, sustancias estructuralmente relacionadas con la droga, impurezas originadas en el proceso de manufactura.

Hay casos en los que no se requiere conocer la identidad de las impurezas, entonces el ensayo se realiza efectuando diluciones convenientes de la muestra problema y realizando una comparación visual de las intensidades de las manchas sobre la cromatoplaca, una vez reveladas. Cuando se necesita identificar y cuantificar alguna impureza en particular es necesario contar con la sustancia de referencia de la misma. Estos ensayos son aplicables tanto a materia prima como a producto terminado.

A continuación, se describen dos ejemplos de aplicación para este tipo de ensayo, uno aplicable a materia prima y otro a producto terminado:

Ejemplo 1: Ensayo de Pureza Cromatográfica - Metoclopramida Clorhidrato Materia Prima - USP 34.

Condiciones Cromatográficas:

Fase estacionaria: silicagel GF_{254}

Fase móvil: cloroformo: metanol: tolueno: hidróxido de amonio (140:60:20:1)

Revelador: UV $_{254nm}$

Especificación: ninguna mancha secundaria presente en el cromatograma de la muestra, debe ser más intensa o más grande que la mancha correspondiente al 0.5 % y la suma de las intensidades de todas las manchas secundarias presentes en el cromatograma de la muestra, no debe ser mayor que el 1.0%.

Nota: Se cuenta con Metoclopramida Clorhidrato Sustancia de Referencia (Título: 100 % sdtc)

Resolución:

Lo primero que debemos considerar es el cálculo del Límite de Detección (LD) de metoclopramida clorhidrato, utilizando la sustancia de referencia de dicho principio activo. A los fines de este capítulo, definimos Límite de Detección como *la menor cantidad de principio activo y/o impurezas o sustancias relacionadas en unidades de masa (µg) que es detectable y cuantificable de manera reproducible en las condiciones de trabajo.*

Para este ejemplo consideraremos el LD = 0.5 µg

En este ejemplo, tenemos que responder a una especificación con dos criterios de aceptación, y no se exige la identificación de las impurezas o sustancias relacionadas, por lo cual no es necesario contar con sustancia de referencia de las mismas. Podemos proceder de acuerdo 2 opciones que se describen a continuación;

Opción1. Considerar que el LD corresponde al 0.5 % de la cantidad a sembrar (en unidades de masa) de la materia prima bajo estudio (una de los criterios de aceptación de la especificación).

Opción 2. Considerar que el LD corresponde a un % de la cantidad a sembrar (en unidades de masa) de la materia prima bajo estudio menor al 0.5 %.

A continuación, desarrollaremos ambas opciones:

Opción 1:

Asignamos al LD (0.5 µg), el 0.5 % respecto de la cantidad a sembrar (en unidades de masa) de la materia prima bajo estudio (Muestra), al realizar está consideración, nos aseguramos que todas aquellas impurezas o sustancias relacionadas que estén presentes en la materia prima en un % ≥ a 0.5%, serán detectadas ya que corresponden a una cantidad igual o mayor al LD, teniendo en cuenta esto último, debemos calcular la cantidad en unidades de masa que debemos sembrar de materia prima en la placa, de manera que todas aquellas impurezas que estén presentes en un % ≥ a 0.5 % puedan ser detectadas.

0.5%..............................0.5 µg (LD)

100%.............................100 µg

Debemos sembrar 100 µg al menos de materia prima bajo estudio, para poder visualizar todas aquellas impurezas o sustancias relacionadas que estén presentes en la misma en un % ≥ a 0.5 %.

Preparación de las soluciones de trabajo:

Solución de Metoclopramida Sustancia de Referencia (Sol. SR 1): 50 mg de la SR, se disuelven en 50 de metanol de manera de obtener una solución de 1 mg/ml – 1 µg/µl.

Sol.SR A: realizar una dilución 1 en 20 de la *Sol. SR 1* en metanol: 0.05 mg/ml- 0.05 µg/µl.

Solución SR para identificación (Sol SR I): realizar una dilución 1 en 2 de la *Sol. SR 1* en metanol: 0.50 mg/ml- 0.50 µg/µl.

Solución de la Muestra en estudio (Sol. M): 500 mg de la materia prima bajo estudio, se disuelven en 50 de metanol de manera de obtener una solución de 10 mg/ml – 10 µg/µl.

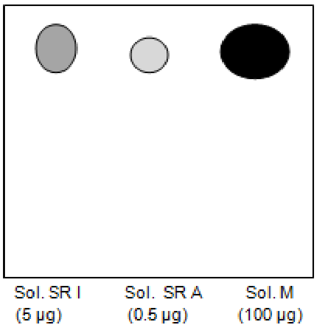
Se siembran 10 µl de cada una de las soluciones, resultando:

Sol. SR I: 0.50 µg/µl x 10 µl= *5 µg*

Sol. SR A: 0.05 µg/µl x 10 µl= *0.5 µg*

Sol. M: 10 µg/µl x 10 µl= *100 µg*

A continuación se muestra la placa cromatográfica resultante:



En este caso, luego de revelar la placa, como no aparece ninguna mancha secundaria en el cromatograma de la muestra y como 0.5 µg, representa el 0.5 % de los 100 µg sembrados de la muestra de la materia prima en estudio,, podemos concluir que ninguna mancha / impureza está presente en un % ≥ al 0.5%, pero no podemos decir nada acerca de la especificación que indica que, la suma de las intensidades de todas las manchas secundarias

presentes en el cromatograma de la muestra no debe ser mayor que el 1.0 %. Por lo tanto la opción desarrollada anteriormente, no es la más adecuada o la más correcta para evaluar el cumplimiento de la especificación tal cual como la hemos planteado. Para responder a la misma y utilizando una sola placa cromatográfica desarrollaremos a continuación la opción 2.

Opción 2: consideraremos que nuestro LD = 0.5 µg, corresponde al 0.1 % respecto del total a sembrar de la materia prima bajo estudio, al proponer está relación, nos aseguramos que todas aquellas impurezas o sustancias relacionadas que estén presentes en la materia prima en un % ≥ a 0.1 %, serán detectadas/ cuantificadas, ya que corresponden a una cantidad igual o mayor al LD, teniendo en cuenta esto último, procederemos a calcular la cantidad en unidades de masa que debemos sembrar de la materia prima bajo estudio en la placa, de manera que todas aquellas impurezas que estén presentes en un % ≥ a 0.1 % puedan ser detectadas / cuantificadas.

0.1 %..............................0.5 µg (LD)

100 %.............................500 µg

Debemos sembrar al menos 500 µg de la materia prima, para poder detectar / cuantificar aquellas impurezas o sustancias relacionadas que estén presentes en la misma en un % ≥ a 0.1 %.

Preparación de las soluciones de trabajo:

Solución de Metoclopramida Sustancia de Referencia (Sol. SR 1): 50 mg de la SR, se disuelven en 50 de metanol de manera de obtener una solución de 1 mg/ml – 1µg/µl.

Solución SR para identificación (Sol SRI): realizar una dilución 1 en 2 de la Sol. SR 1 en metanol: 0.50 mg/ml- 0.50 µg/µl.

A partir de la *Sol. SR 1* realizamos las diluciones en metanol, que se describen en la siguiente Tabla:

Sol. SR	Dilución	Conc. µg/µl	Porcentaje (%) respecto de la cantidad sembrada de MP
A	1 en 4	0.25	0.5
B	3 en 20	0.15	0.3
C	1 en 20	0.05	0.1

Tabla 1. *Diluciones correspondientes a la Solución SR1*

Solución de la Muestra en Estudio (Sol. M): 500 mg de la materia prima bajo estudio, se disuelven en 10 ml de metanol de manera de obtener una solución de 50 mg/ml – 50 µg/µl.

Se siembran 10 µl de cada una de las soluciones, resultando:

Sol. SR1: 0.50 µg/µl x 10 µl= *5 µg*

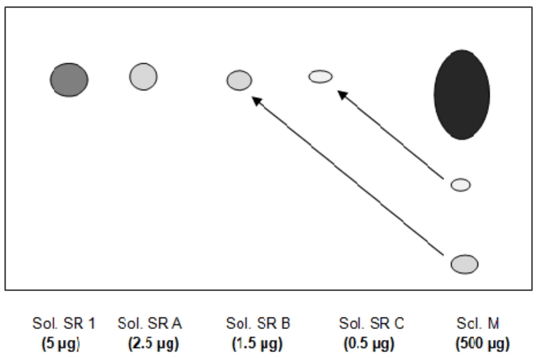
Sol. SR A: 0.25 µg/µl x 10 µl= *2.5 µg*

Sol. SR B: 0.15 µg/µl x 10 µl= *1.5 µg*

Sol. SR C: 0.05 µg/µl x 10 µl=*0.5 µg*

Sol. M: 50 µg/µl x 10 µl= *500 µg*

A continuación en una placa cromatográfica, se ejemplifica uno de los resultados posibles:



A partir de la placa anterior, observamos que aparecen dos manchas secundarias en el cromatograma de la muestra, para comprobar el cumplimiento o no de la especificación, procederemos de la siguiente manera: comparamos el tamaño e intensidad de cada una de las manchas secundarias presentes en el cromatograma de la muestra, con el tamaño e intensidad de las manchas de las soluciones de referencia, en este caso, observamos que ambas manchas secundarias tienen un tamaño e intensidad menor que la mancha de la Sol. SR A (0.5%), por lo tanto podemos confirmar, que ninguna impureza está presente en un % ≥ al 0.5 % en la muestra evaluada, las otras manchas secundarias presentes, corresponden al 0.3 % y al 01 %, resultando la suma de todas las manchas secundarias presentes en el cromatograma de la muestra igual al 0.4%, lo cual es menor que el límite máximo permitido del

1% de la especificación. Procediendo de acuerdo a lo descripto en la opción 2, podemos responder a la especificación y podemos concluir que la materia prima bajo estudio, cumple con el Ensayo de Pureza Cromatográfica.

Ejemplo 2: Ensayo de Sustancias Relacionadas Paracetamol Comprimidos – British Pharmacopoeia - 2005.

Condiciones Cromatográficas:

Fase estacionaria: silica gel GF_{254}

Fase móvil: tolueno: acetona: cloroformo (10:25:65)

Revelador: UV_{254nm}

Especificación: Ninguna mancha correspondiente a 4´cloroacetanilida, presente en el cromatograma de la solución Muestra 1 no debe ser más intensa que la intensidad de la mancha obtenida con la solución 3. Ninguna mancha secundaria obtenida en el cromatograma de la solución Muestra 2 con R_f menor que la 4´cloroacetanilida debe ser más intensa que la mancha obtenida con la solución 3. El ensayo es válido si el cromatograma obtenido con la solución 4, muestra claramente la separación entre las dos manchas principales y la mancha correspondiente a la 4´cloroacetanilida, tiene mayor valor de R_f.

Formula cuali-cuantitativa - Paracetamol comprimidos:

Paracetamol ……………1000 mg

Excip. Csp……………….1350 mg

En la monografía correspondiente se describe el siguiente procedimiento para la preparación de las distintas soluciones.

Preparación de las soluciones de trabajo:

Solución Muestra 1 (Sol. M1): se pesan 10 comprimidos de paracetamol, se pulverizan en mortero y a partir del polvo se pesan 1350 mg, equivalentes a 1000 mg de paracetamol, se transfieren a un tubo de centrifuga de 20 ml y se adicionan 5 ml de éter libre de peróxido, se agita durante 30 minutos, se centrifugan a 1000 r.p.m. durante 15 minutos y a partir de sobrenadante se siembran 200 µl.

Solución Muestra 2 (Sol. M2): diluir 1 ml del sobrenadante de la solución Muestra 1 a un V_f de10 ml con etanol 96%.

Solución 4´cloroacetanilida (Sol. 3): 50 mg de 4´cloroactenailida Sustancia de Referencia (SR) se transfieren a matraz de 10 ml y se completa a volumen con etanol al 96%, posteriormente se realiza una dilución 0.1:10 con el mismo medio (Solución 3: 0.005% P/V) - se siembran 40 µl

Solución 4 (Sol.4): se pesan 0.25 g de 4´cloroacteanilida (SR) + 0.1 g paracetamol y se disuelven en 100 ml de etanol 96%. Se siembra 40 µl

Sol. MI: 200 µg/µl x 200 µl= *40000 µg*

Sol. M2: 20 µg/µl x 40 µl= *800 µg*

Sol. 3: 0.05 µg/µl x 40 µl= *2 µg*

Sol. 4: (2.5 µg/µl +1 µg/µl) x 40 µl =*100 µg + 40 µg*

En este ejemplo, si necesitamos contar con sustancia de referencia de 4´cloroacetanilida ya que debemos identificar y cuantificar la misma. Si transformamos la especificación en unidades correspondientes al porcentaje (%) máximo de sustancias relacionadas presentes en la muestra bajo estudio resulta:

4´Cloroacetanilida:

40000 µg…………100 %

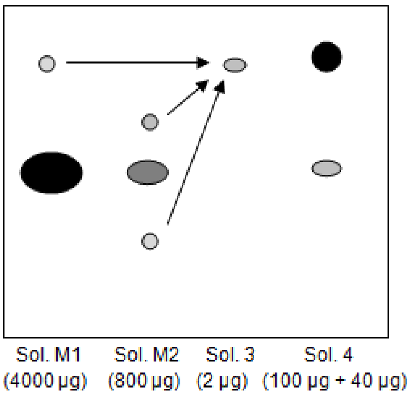
2 µg………………0.005 %

Otras sustancias relacionadas, diferentes de 4´Cloroacetanilida:

800 µg…………100 %

2 µg……………0.25 %

A continuación en una placa cromatográfica, se ejemplifica uno de los resultados posibles:



Analizando la placa anterior, podemos concluir, que el ensayo es válido ya que la 4´cloroacetanilida y el paracetamol se separan perfectamente entre sí, y el R_f de la 4´cloroacetanilida es mayor que el R_f del paracetamol (validación in situ), y que la muestra de comprimidos de paracetamol analizada cumple las especificaciones.

Análisis cuantitativo. Cuando se aplica TLC al análisis cuantitativo, se deben remover cuidadosamente las manchas desde la cromatoplaca, luego eluirlas con un solvente adecuado y posteriormente aplicar un método cuantitativo que permita detectar pequeñas cantidades (ej. Espectrofotometría UV), o bien medir intensidades de manchas por densitometría sin necesidad de removerlas de la cromatoplaca. Una estimación semicuantitativa puede realizarse por comparación visual del tamaño e intensidad de las manchas.

Técnica general

La técnica de TLC comprende diferentes etapas:

- Preparación de la cámara de desarrollo
- Activación de la placa
- Siembra de las muestras
- Corrida de la placa
- Revelado o localización de las manchas

Ver descripción de las mismas en FA. Vll ed. (pág. 63); USP 23 (pág. 1770/71); Farmacopea Británica 93 (pág. A92/A93).

Además de la forma de cromatografía convencional, descripta en la bibliografía mencionada, donde se corre la fase móvil en dirección ascendente, hasta que la misma haya recorrido las tres cuartas partes de la placa, existen otros tipos de desarrollo:

Desarrollo Múltiple. Consiste en correr primero con una fase móvil, secar y correr luego con la misma fase o con otra más polar o de diferente pH, en la misma dirección. Este proceso puede repetirse cuantas veces sea necesario

para lograr la separación. Esta técnica es particularmente útil para separar compuestos de polaridades diferentes.

*Cromatografía bidimensiona*l: consiste en correr la placa en una dirección con la primera fase móvil, secar, girar la placa 90° y correr nuevamente usando una fase móvil diferente.

Materiales

Fase Estacionaria: La fase estacionaria (FE) se adhiere convenientemente a una placa de vidrio, lámina de aluminio, o plástico. La adherencia se logra con el agregado de sulfato de calcio a la FE. Si bien el vidrio es el soporte más conocido, los otros dos tienen la ventaja de poder cortarlos en placas menores por su flexibilidad. Muchas de las FE son adsorbentes (ej. silicagel, alúmina) y la separación ocurre por interacción de las sustancias con la FE. Otras (ej. celulosa) operan primariamente por partición de la muestra entre FE y FM, aunque generalmente es un proceso combinado. Cuando la FE es más polar que la FM el sistema se denomina de *fase normal* (ej. silicagel con solventes orgánicos no polares); cuando la FE es la menos polar de las dos fases, el sistema se denomina de *fase reversa* (ej. placa impregnada de parafina usando una FM acuosa). Las Fases Estacionarias pueden ser inorgánicas, orgánicas o mixtas.

Inorgánicas: silicagel; alúmina; silicato de magnesio (Florisil); etc. La silica gel o SiO_2, es el más usado de los adsorbentes: contiene grupos silanoles responsables de actividad adsorbente y es de naturaleza débilmente ácida. Las placas tienen una distribución uniforme de tamaño de partícula normalmente alrededor de 20 μm de diámetro. Puede contener sulfato de calcio hidratado (SO_4Ca. $1/2H_2O$) como aglutinante (en proporción 5%-15%), en cuyo caso se denomina silicagel G. La silicagel H no contiene SO_4Ca. $1/2H_2O$, ni otro aglutinante. También existe silicagel G o H con indicador de fluorescencia (F_{254}), la materia fluorescente es un silicato de Zn activado con Mn. La alúmina o Al_2O_3 es otro adsorbente bastante empleado; puede ser neutro (pH 7.5),

alcalino (pH 9) o ácido (pH 4). Su actividad de adsorción es menor que la silicagel y necesita ser activada para obtener mejores separaciones. Tiene el inconveniente de producir reacciones colaterales, como por ej. hidrólisis, apareciendo entonces dos manchas cuando en realidad la sustancia no estaba impurificada.

Orgánicas: celulosa, urea, poliamida, carbón, sacarosa, etc. La celulosa imita muy bien a la cromatografía en papel, el mecanismo de separación es partición. La velocidad de corrida es mayor que con la silicagel a igual espesor.

Mixtas: Resultan de la combinación de las fases anteriores.

Otras fases estacionarias:

Fases Reversas

Los sistemas de fase reversa consisten en placas de silicagel impregnadas con materiales tales como parafina, siliconas, grasas, con fases móviles acuosas. Estos sistemas tienen una buena separación para un rango amplio de sustancias, pero tiene la desventaja de su lenta velocidad de corrida, y pobre reproducibilidad. Otros sistemas de fase reversa, consisten en placas de silica modificada, por unión de cadenas hidrocarbonadas de distinta longitud, a los grupos silanoles libres; estos sistemas tienen alta resolución. Las más conocidas son las fases con cadenas de C_{18} (octadecyl). Pueden ser usadas como fases móviles Metanol : Agua o Acetonitrilo : Agua.

Resinas de Intercambio Iónico

Estas placas de TLC poseen resinas de intercambio catiónico o aniónico unidas a su superficie. Las resinas son de estireno-divinilbenceno con grupos amonio cuaternario o ácido sulfónico para el intercambio iónico.

El contenido de agua juega un papel importante en la actividad del adsorbente ya que por ej. en el caso de la sílicagel se solvatan los grupos silanoles que son los sitios activos, impidiendo la unión a los mismos de las sustancias a cromatografiar, afectando consecuentemente la reproducibilidad del sistema.

La Alúmina se presenta en cinco grados de activación, de I a V según su contenido acuoso; la de grado I no contiene agua por lo tanto es la de mayor actividad y el contenido acuoso aumenta hasta llegar a la de grado V.

Determinación de la actividad de los adsorbentes.

Existen métodos para medir la actividad del adsorbente por ej. el Método de Brockman y Schodder que utiliza para determinar el grado de actividad de una alumina, una serie de azo-colorantes que ordenados de acuerdo a su creciente adsorbibilidad son:

1. Azobenceno
2. p- Metoxiazobenceno
3. Benceno-azo-2-naftol (Amarillo Sudan)
4. Rojo Sudan (Sudan III)
5. p-Aminoazobenceno
6. p-Hidroxiazobenceno

Para ello se siembra un volumen determinado de una mezcla de estos colorantes en solución, en distintas columnas que contienen alúmina con distinto grado de activación, dado por su % de agua y luego se hace pasar por todas ellas un mismo volumen del mismo eluyente. La velocidad de corrida de cada colorante dependerá de la actividad del adsorbente. Por ej. la alúmina de mayor actividad , es decir la que no contiene agua adsorberá azobenceno, o sea el colorante de menor adsorbibilidad, en la parte inferior de la columna, en la parte superior de la misma se adsorberá p-metoxiazobenceno, es decir el que le sigue en poder adsorbente y no eluye fuera de la columna ningún colorante, todos los demás quedarán retenidos en el punto de siembra. En la de grado II (3% de agua) el azobenceno se eluye fuera de la columna, el metoxiazobenceno es retenido en la parte inferior, el amarillo sudan queda en la parte superior de la columna y el resto en el punto de siembra y así sucesivamente. La alúmina de grado III tiene un 6% de agua, la de grado IV un 10% y la de grado V 15% de agua. La actividad I se logra por calcinación, mientras que las otras se consiguen por exposición prolongada al aire. Si tenemos una alúmina de actividad desconocida, rellenamos con ella una

columna y sembramos la mezcla de colorantes, según el comportamiento de los mismos podremos deducir su actividad.

En lugar de columnas pueden utilizarse placas de TLC determinando el Rf de cada colorante.

Otro método es el Índice de Azobenceno: se mezclan 0.5 g de adsorbente con 3 ml de una solución 0.1 M de azobenceno puro en ciclohexano puro, en un recipiente de tapa hermética y se agita repetidamente. Al cabo de una hora el líquido sobrenadante se centrifuga y se lee su absorbancia determinándose la perdida de azobenceno mediante el uso de curvas de calibración. Se calcula la cantidad adsorbida en moles/ gramo de adsorbente por medio de la siguiente ecuación:

Moles/gramo = $a/m\ (C_1 - C_2)$

a = volumen de la solución del colorante.

m = gramos de adsorbente

C_1 y C_2 = concentración inicial y final del colorante

Fase Móvil (Eluyente): La elección de la fase móvil (FM), dependerá de las sustancias a cromatografiar. Puede estar constituida por un solvente orgánico o mezcla de los mismos, pudiendo también agregarse ácidos o bases para controlar la elución. Los solventes usados deben ser secados y redestilados, estables al aire, no tóxicos y no reaccionar con la sustancia a separar.

Existen series que indican la diferencia de poder eluyente y se denominan series eluotrópicas, las mismas se describen en la Tabla 2.

Según Wohlleben	Según Strain
n-pentano	Éter de petróleo (30-50 C)
Éter de petróleo	Éter de petróleo (50-70 C)
n-hexano	Éter de petróleo (70-100 C)
n-heptano	Tetracloruro de carbono
Ciclohexano	Ciclohexano
Tetracloruro de carbono	Sulfuro de carbono
Tricloro etileno	Éter dietílico
Benceno	Acetona
Diclorometano	Benceno
Cloroformo	Tolueno
Dietiléter	Ésteres de ácidos orgánicos
Acetato de etilo	1,2 dicloro etano
Piridina	Cloroformo
Acetona	Alcoholes
n-propanol	Agua
Etanol	Piridina
Metanol	Ácidos orgánicos
Agua	Mezcla de ácidos con bases, agua, alcohol o piridina

AUMENTO DE POLARIDAD

Tabla 2. *Series eluotrópicas*

Muestra a cromatografiar: En términos generales si la sustancia a cromatografiar es poco polar, se trabajará con adsorbentes fuertes y eluyentes débiles. Para sustancias polares se trabajará con adsorbentes débiles y eluyentes fuertes.

1. Los hidrocarburos saturados son poco adsorbidos. La introducción de dobles enlaces en la molécula, aumenta la polaridad de las moléculas y con esto la fuerza adsortiva sobre el adsorbente.

2. Si se introducen grupos funcionales en una cadena hidrocarbonada aumenta la afinidad de adsorción. La serie de adsorción descendente es:

$-COOH > CONH_2 > NHCOCH_3 > NH_2 > OCOCH_3 > N\text{-}(CH_3)_2 > NH_2 > OCH_3 > H > Cl$

3. En una molécula en la que se encuentran presentes varios grupos funcionales, la afinidad por el adsorbente la da el grupo funcional más hidrófilo no existiendo aditividad con respecto a su influencia sobre la afinidad de adsorción.

Reveladores: Muchas sustancias pueden ser localizadas examinando la placa conteniendo un indicador de fluorescencia, bajo luz UV a longitudes de onda corta (254 nm); los compuestos que absorben en la región del UV pueden verse entonces como manchas oscuras sobre un fondo verde fluorescente.
Puede también usarse para revelar luz UV de longitud de onda larga (360 nm), las sustancias de naturaleza fluorescente podrán visualizarse. Algunas sustancias no absorben luz UV, porque se encuentran en su forma iónica en la placa debido al pH de la FE o de la FM. Por ej., los barbituratos no son visibles si la placa es ácida, pero pueden rápidamente detectarse si se somete a la placa a vapores de amoniaco. Similarmente muchas bases pueden ser localizadas si se cambia el pH de la placa por exposición a vapores de ácido clorhídrico. Muchas sustancias que no presentan color propio, absorción al UV, ni fluorescencia se detectan con reactivos específicos que se pulverizan sobre la placa. La aspersión no debe ser excesiva con objeto de que no difundan las manchas. Se pueden usar reactivos agresivos como ácido sulfúrico concentrado, ácido sulfocrómico, ácido sulfúrico- ácido nítrico, y carbonizar las sustancias orgánicas por calentamiento a temperaturas elevadas.
Agregando 0.5% de aldehidos (p-dimetilaminobenzaldehído, vainillina, aldehído anísico, aldehído salicílico o formaldehído) al ácido sulfúrico se obtiene en frío colores intensos y calentando a temperaturas entre 100° y 300° C son visibles un amplio espectro de compuestos. Muchas sustancias son detectadas con I_2. El I_2 se une físicamente a los compuestos, por lo tanto puede luego eliminarse.
En la bibliografía de referencia se describen más métodos específicos para determinados grupos funcionales (ej. ninhidrina para aminas primarias) o grupos de compuestos (ej. Reactivo de Dragendorff para alcaloides).

Técnicas especiales

Cromatoplacas con zonas de concentración. Tienen dos zonas en la misma placa, la primera contiene un adsorbente inerte o de poca capacidad adsorbente, por ej. Kieselgur (tierra de diatomeas) y la segunda un adsorbente

activo ej. silicagel. Se utiliza cuando la muestra es compleja, por ej. formas farmacéuticas con excipientes, cuando las sustancias se degradan al sembrar, o cuando tienen muchas impurezas de tipo orgánicas, y de esta manera se limpian (clean up), pues son retenidas en el Kieselgur. En estas placas no es necesario sembrar en punto o banda, puede colocarse la placa directamente en la solución de siembra porque todas corren en forma de bandas.

Cromatografía en Capa Fina de Alta Performance HPTLC. Esta técnica utiliza placas de silicagel con tamaño de partícula de aproximadamente 5μm, mientras que las comunes el tamaño es de 20μm. Para el desarrollo de estas placas se usan cámaras de desarrollo horizontal, con las cuales se puede sembrar en ambos extremos de la placa y el solvente corre desde ambos extremos hacia el centro. La cámara posee dos pequeñas cubetas en los extremos para colocar el solvente, y esto posibilita el uso de dos solventes distintos, las placas se ponen con el adsorbente para abajo, en forma horizontal. Para la cuantificación, este tipo de técnica permite el uso solamente de Densitometría. Los densitómetros miden la intensidad de la mancha, pueden trabajar en modo transmitancia, fluorescencia o reflexión, es decir se mide la cantidad UV o Visible transmitida, fluorescente o reflejada, luego se transforman estos valores en áreas que son proporcionales a la concentración. Un densitómetro consta de una fuente luminosa, un filtro, un colimador, una fotocélula y un galvanómetro. La cromatoplaca se coloca entre la fuente luminosa y la fotocélula y la radiación se mide usando como referencia un lugar de la placa sin muestra. Las señales se transmiten a un registrador donde las manchas aparecen en forma de picos cuya área es proporcional a la concentración de la sustancia.

*Ventajas de la HPTLC***:** mayor resolución debido al menor tamaño de partícula lo cual implica mayor superficie expuesta, mayor sensibilidad, tiempos más breves, recorridos más cortos y mayor reproducibilidad. Las propiedades cromatográficas de este tipo de TLC correlacionan muy bien con los sistemas de HPLC que usan la misma fase estacionaria.

Es útil para trabajos preparativos y su uso se ha incrementado a partir de la aplicación de muestras con sembradores automáticos y la cuantificación por

medio de densitómetros. En la Tabla 3 se resumen las diferencias entre TLC y HPTLC.

Condiciones Típicas	TLC	HPTLC
Dimensiones de la placa (cm)	20 x 20	10x10
Tamaño de partícula (silicagel) (μm)	Alrededor de 20	Alrededor de 5
Espesor de la placa (μm)	100 - 250	150 - 200
Volumen de muestra (μl)	1 - 10	< 0.1
Diámetro de la mancha antes de corrida (mm)	< 4	< 1.5
Diámetro de la mancha después de corrida (mm)	5 - 10	2 -5
Distancia de corrida (cm)	10 - 15	3 - 6
Tiempo de corrida (min)	30 - 120	5 - 15
Número de muestras por placa	10 - 15	30 - 40
Límite de detección (Absorción) (ng)	10 - 100	30 - 40
Límite de detección (fluorescencia) (ng)	0.1 - 1	0.01 – 1.0
Reproducibilidad de Rf	Alrededor 3%	Alrededor 1%
Reproducibilidad de cuantificación	Alrededor 5%	2 % - 3%

Tabla 3. *Diferencias Principales entre TLC y HPTLC*

En la figura 1 se describe de manera esquemática el procedimiento para el desarrollo de HPTLC.



Figura 1. *Procedimiento para el desarrollo de HPTLC*

TLC Preparativa. Como técnica preparativa TLC es usada por ej., para el aislamiento de componentes de mezclas para su posterior estudio como para la obtención de materiales puros para ser usados como sustancias de referencia.
En TLC preparativa el espesor de la capa de adsorbente es mayor (0,5 a 2mm), lo cual permite sembrar mayor cantidad de muestra. Es mejor aplicar la muestra en forma de banda que de punto, (se puede cromatografiar más muestra al mismo tiempo) La visualización de las manchas debe hacerse por métodos no destructivos, por ejemplo UV.

***Agradecimiento*:** A la Lic. Analía Nolasco por el diseño de las figuras y gráficos incluidos en el presente capítulo.

Preguntas Orientadoras

1. Describa los factores que influyen o afectan la reproducibilidad del R_f.
2. Describa las diferencias fundamentales entre TLC y HPTLC.
3. Que mecanismo/s se pone/n en juego en la separación por TLC.
4. Describa en que consisten los sistemas de fase reversa.
5. Detalle el procedimiento para el análisis cuantitativo por TLC**.** Utilizaría un método Volumétrico para cuantificar las manchas?. Justifique

Test de Autoevaluación

1. En este capítulo se define el Límite de Detección como:
   (a) La menor concentración de principio activo y/o impurezas o sustancias relacionadas en unidades de masa (µg) que es detectable y cuantificable de manera reproducible en las condiciones de trabajo.

(b) La menor cantidad y concentración de principio activo y/o impurezas o sustancias relacionadas en unidades de masa (µg) que es detectable y cuantificable de manera reproducible en las condiciones de trabajo.

(c) La menor cantidad de principio activo y/o impurezas o sustancias relacionadas en unidades de masa (µg) que es detectable y cuantificable de manera reproducible en las condiciones de trabajo.

2. Durante el ensayo de Pureza Cromatográfica o Sustancias relacionadas siempre debo:

(a) Contar con sustancia de referencia del principio activo y de todas las impurezas o sustancias relacionadas.

(b) Nunca debo contar con sustancia de referencia de las impurezas o sustancias relacionadas.

(c) Siempre debo contar con sustancia de referencia del principio activo.

(d) Ninguna es correcta

3. La cromatografía en Fase reversa está constituida por:

(a) Fase Estacionaria Polar y Fase Móvil Polar

(b) Fase Estacionaria Polar y Fase Móvil No Polar

(c) Fase Estacionaria No Polar y Fase Móvil Polar

(d) Ninguna es correcta.

4. Cual o cuales de las siguientes opciones son correctas:

(a) La HPTLC, posee menos resolución y utiliza menor tamaño de partícula de la sílica menor que la TLC.

(b) La reproducibilidad para el R_f en TLC es menor que en HPTLC.

(c) La reproducibilidad para la cuantificación y el tiempo de corrida es menor en HPTLC que en TLC.

(d) El límite de detección (absorción) es mayor en TLC que en HPTLC.

Bibliografía

1. Kurt Randerath (1969). *Cromatografía de capa fina.* Bilbao: Urmo.
2. K.A.Connors (1980). *Curso de Análisis Farmacéutico*. 2da. Ed. 1980.
3. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VII ed. (2003) Buenos Aires.
4. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 34) (2011) Rockville.
5. Farmacopea Británica (2003)
6. ManMonham, Srrivastava (2011) *High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)*. Springer – Verlag Berlin Heidelberg.

CAPITULO 4

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

María Guillermina Volonté

Su aplicación al Análisis Farmacéutico

Introducción

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es una técnica de separación muy utilizada debido a su gran versatilidad, ya que cubre un amplio espectro de aplicaciones, con rapidez y con excelentes resultados, siendo además un muy buen método analítico cuantitativo. Se aplica en casi todos los laboratorios donde se realizan análisis químicos, bioquímicos y farmacéuticos, tanto de rutina como de investigación.

Mediante HPLC se separan los componentes de una mezcla, en base a la migración diferencial de los mismos, en un sistema que consta de dos fases, una móvil, que fluye continuamente en una determinada dirección, y otra estacionaria, que permanece fija. Se realiza en columna y por sus características particulares se ha convertido en una de las de mayor rendimiento y eficacia

Durante muchos años se practicó la cromatografía líquida en una forma que llamaremos "clásica" y que consistió básicamente en lo siguiente: una columna de vidrio, cuyo diámetro variaba entre 2-10 cm, una longitud de 50-500 cm, rellena de algún material, como silicagel, alúmina, etc., cuyas partículas poseían un tamaño entre 150-200 µm, en la que la muestra se introducía disuelta en la fase móvil u otro disolvente y luego se agregaba el mismo, con el cual eluía a través de la columna. Los tamaños de la muestra variaban entre 0,1-1,0 g o más. El disolvente o fase móvil fluía a través de la columna por efecto de la gravedad y se recolectaba en la base de la misma en fracciones de determinado volumen. Uno de los inconvenientes de esta técnica era el largo tiempo de análisis requerido, horas o días, otra desventaja era que el material

de relleno se utilizaba por lo general una sola vez debido a que parte de la muestra se adsorbía en forma irreversible en él.

Otro problema consistía en la identificación y cuantificación de los componentes separados, en general mediante técnicas auxiliares, como ser la espectrofotometría, gravimetría, etc.

En HPLC en cambio, se usan columnas de acero inoxidable, de diámetro muy reducido, por ejemplo 2 mm, rellenas de materiales cuyas partículas tienen un tamaño no mayor de 30–40 µm, usualmente entre 3-10 µm. Este tipo de columna ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, o sea una gran caída de presión. Por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 6000 psi) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña, por lo que se requiere que la muestra también sea pequeña, en el rango de µg a pocos mg.

La muestra se introduce en el sistema mediante válvulas de inyección.

Un detector, colocado a la salida de la columna, proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale, por lo que permite obtener un cromatograma que se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de la muestra.

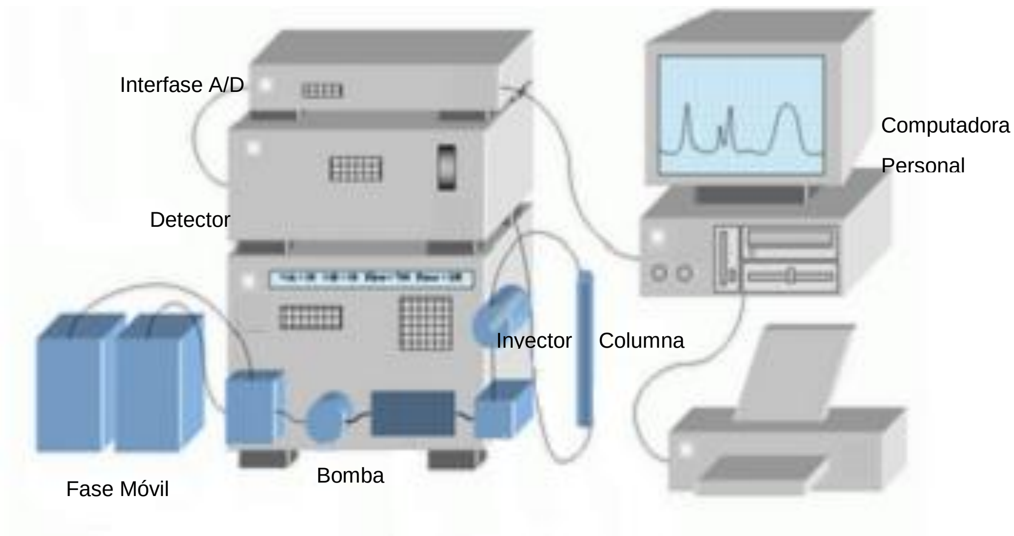


Figura 1. *Esquema de un HPLC tipo*

Ventajas y limitaciones de la HPLC

Ventajas:

- Con esta técnica es usual obtener separaciones en el término de minutos y hasta segundos.
- Otra ventaja es la alta resolución que permite separar mezclas muy complejas, por ejemplo muestras de fluidos biológicos, como la orina, plasma, etc.
- También proporciona muy buena información de tipo cuantitativo.
- Presenta un escaso deterioro de la columna a pesar de su repetido uso.
- Quizás la ventaja más importante sea la diversidad de sus aplicaciones, tanto a compuestos orgánicos como inorgánicos, a muestras de alto y bajo PM, a sustancias sólidas y líquidas, iónicas o covalentes. Desde el punto de vista práctico las únicas muestras que no son susceptibles de ser analizadas por HPLC son las gaseosas.
- Por último presenta la gran ventaja de automatizar los instrumentos de forma tal que realicen el análisis completo de la muestra, desde su introducción en el cromatógrafo hasta el cálculo e impresión de los resultados, en forma automática.

Limitaciones:

- Instrumental costoso.
- El personal que utilice esta técnica tendrá que tener experiencia como para poder obtener el mayor provecho de la técnica instrumental.
- La comparación de los tiempos de retención, como método de identificación, no es confiable, por lo que será necesario emplear otras técnicas, tales como Espectroscopia de Masa, IR, o Resonancia Magnética Nuclear para obtener identificaciones más precisas.
- No existe aún un detector universal y sensible para HPLC, el detector de índice de refracción es de respuesta universal pero de limitada

sensibilidad y el detector de luz UV es sensible, pero su respuesta es selectiva y responde solo a compuestos que absorben radiación UV.

Tipos de mecanismos de separación

Hay cinco métodos de realizar la HPLC, cada uno basado en diferentes mecanismos de separación de los componentes de la muestra:

1. *Cromatografía líquido-líquido:* El mecanismo de separación se basa en la distinta solubilidad que presenta una molécula de la muestra en la fase móvil y en la fase estacionaria, ambas líquidas. Se utiliza para compuestos moderadamente polares, cuyo PM sea inferior a 1500. El mayor inconveniente de esta técnica es la solubilidad de la fase estacionaria en la fase móvil y el deterioro de la columna. Una forma de resolverlo es saturando la fase móvil con la fase estacionaria por medio de una precolumna que contenga un alto porcentaje de fase estacionaria.

2. *Cromatografía de fase químicamente unida o fase ligada*: Surgió como otra forma de evitar la solubilización de la fase estacionaria en la fase móvil, ya que utiliza materiales que contienen la fase estacionaria químicamente unida a la superficie de un soporte (generalmente partículas de sílice), a través de sus grupos funcionales. Estos pueden ser de naturaleza polar, como el grupo amino ($-NH_2$) y el nitrilo (-CN) en el caso de la cromatografía de fase normal, o bien no polar como el grupo octilo ($-C_8H_{17}$), octadecilo ($-C_{18}H_{37}$), fenilo ($-C_6H_5$), en el caso de la cromatografía de fase reversa.

El mecanismo de separación de esta técnica es complejo, con características similares a las de la cromatografía líquido-sólido.

3. *Cromatografía líquido-sólido*: Llamada también de Adsorción, cuyo mecanismo se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil o disolvente por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido polar, como es la silicagel o la alúmina. Se aplica a moléculas de baja o media polaridad, de PM no mayor a 1000.

4. *Cromatografía de exclusión molecular*: Este tipo de cromatografía conocida también como cromatografía de Permeación o de Filtración, efectúa la separación de acuerdo con el tamaño de las moléculas. Las columnas se rellenan de un gel, cuyos poros son de tamaño similar al tamaño de las

moléculas de la muestra. Las moléculas pequeñas pueden penetrar dichos poros y quedan retenidas, en tanto que las grandes no lo hacen. El intervalo de PM de las muestras está entre 500 hasta varios millones.

Las dos variantes que existen en cromatografía de exclusión son: la Cromatografía de Permeación en gel y la Cromatografía de Filtración en gel, ésta última emplea materiales blandos (dextranos) incapaces de resistir presiones mayores de 60 psi y es muy aplicada en el estudio de biopolímeros. En cambio la cromatografía de Permeación emplea materiales de relleno semirígidos (poliestirenos) o rígidos (silica porosa, vidrio poroso) que pueden resistir presiones muy elevadas y es aplicada en estudios de polímeros sintéticos (poliolefinas, poliamidas). Aunque existen excepciones, la eficiencia de las columnas de cromatografía de exclusión es relativamente baja, por lo cual no es corriente en esta técnica obtener la separación de compuestos individuales, sino más bien fracciones de un cierto intervalo de PM.

5. *Cromatografía de intercambio iónico*: Se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios ó grupos activos de una resina intercambiadora. Se aplica a compuestos de un intervalo de PM muy amplio, por ejemplo péptidos y aminoácidos.

Términos y símbolos característicos

- Cromatograma: Gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del eluente u otra cantidad usada como una medida de concentración del eluente, versus el volumen de eluente o tiempo (IUPAC).

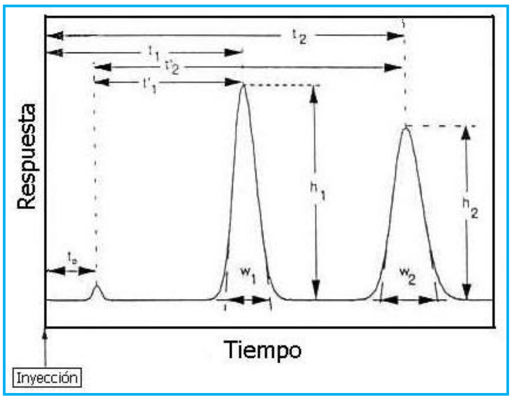


Figura 2. *Cromatograma tipo*

El cromatograma se inicia en el momento en que la solución muestra es inyectada. Las señales encontradas en el cromatograma pueden ser:

- Volumen de elución (V_e): es el volumen de fase móvil eluida entre la inyección y la detección de la concentración máxima de cada componente de la muestra.
- Volumen muerto (V_0): es el volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas de la fase estacionaria y todos los espacios libres existentes en la columna, en las tuberías, uniones, etc. La solución atraviesa estos espacios, sin participar en ningún proceso separativo.
- Línea de Base: es la porción del cromatograma donde sólo se aprecia la elución de la fase móvil, sin señal debida a los componentes de la muestra.
- Tiempo de Retención (t_n): es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima de cada componente de la muestra (máxima señal). La distancia entre este máximo de la señal y la línea de base es la altura del pico (h_n).
- Tiempo muerto (t_0): es el tiempo del primer pico que aparece, no perteneciente a ningún componente de la muestra. Como su valor se utiliza en algunos cálculos cromatográficos hay que determinarlo con exactitud, no se tiene la completa seguridad de que el primer pico, generalmente debido al solvente de disolución de la muestra o a alguna impureza desconocida, sea el correcto. Para su estimación pueden utilizarse, en Fase Reversa, soluciones diluidas de nitrato de sodio o de dicromato de potasio.
- Tiempo de Retención neto o relativo (t'_n): también llamado tiempo de retención ajustado o corregido, es la diferencia entre el tiempo de retención de un pico y el tiempo muerto.
- Anchura de la base de la señal o Ancho de Pico (w): es la porción de la línea de base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica. Este valor de anchura se emplea en el cálculo de la resolución (R) y eficiencia de los sistemas cromatográficos (N). Se puede calcular tomando el ancho en distintas posiciones, por ejemplo al 50 % de la altura de pico, al 60.7 %, etc.

▪ Número de platos teóricos (N): un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. El número de platos teóricos se calcula como: $N = a\,(t_n/w)^2$

El valor de (a) puede variar de acuerdo a cómo se determine el ancho de pico (w), ver la siguiente tabla:

w	**a**	**Altura de pico (%)**
w_i	4	60,7% (inflexión)
w_h	5,54	50% (media onda)
w_3	9	32,4% (3σ)
w_4	16	13,4% (4σ)
w_5	25	4,4% (5σ)
w_{tan}	16	tangente

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados y por lo tanto de su poder separativo, es así que cuanto mayor sea N, más eficiente será la columna, nos dará picos más estrechos y mejor separados.

▪ Altura equivalente del plato teórico (H): se calcula como:

$$H = \frac{L}{N}$$

donde L es la longitud de la columna expresada en mm. Si el valor de H es pequeño, esto se traduce en un mayor número de platos teóricos por unidad de longitud y por lo tanto la columna será más eficiente. Sirve para comparar columnas de distinta longitud.

▪ Velocidad lineal (μ): para la comparación de métodos que emplean columnas de diferente diámetro interno es preferible la expresión de la velocidad lineal en lugar del caudal. Se expresa en cm/seg y se calcula:

$$\mu = \frac{L}{t_0}$$

▪ Factor de Capacidad (k'): Conceptualmente es la relación entre el número de moles de cada componente de una muestra en la fase estacionaria

y el número de moles del mismo en la fase móvil. Como k’ es proporcional al tiempo de retención del soluto se calcula para el pico enésimo como:

$$k' = \frac{(t_n - t_0)}{t_0} = \frac{(V_n - V_0)}{V_0}$$

k’ puede variar entre cero (si no es retenido en la fase estacionaria) e infinito (si se retiene en forma irreversible). Se ajusta modificando la fuerza de elución de la fase móvil, por ejemplo:

* En fase reversa k’ disminuye al aumentar la proporción del compuesto orgánico (metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano) y aumenta al aumentar la proporción de fase acuosa.

* En fase normal k’ disminuye al aumentar la proporción de solvente polar y aumenta al aumentar la proporción del no polar.

* En cromatografía de intercambio iónico la variación del pH de la fase móvil puede aumentar o disminuir k’ de acuerdo a las características ácido-base del analito.

- Factor de Separación (α): es el cociente entre los factores de capacidad de un par de picos. Si no existe separación entre dos picos, por ejemplo pico 1 y 2, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación. Se calcula como:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

No depende de la fuerza de elución, sino de la afinidad del soluto respecto de la fase móvil y de la columna.

La variación de α puede lograrse:

* modificando el componente activo de la fase móvil (metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, en fase reversa o Cloroformo en fase normal)

* modificando el pH de la fase móvil

* empleando aditivos (reactivos de apareamiento, complejantes, etc.)

* cambiando la fase estacionaria

- Resolución (R): es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos:

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{1/2 \cdot (w_2 + w_1)}$$

Un valor de R≥ 1,5 significa separación completa.

- Asimetría (As): la asimetría (tailing) es una medida de la simetría del pico, tiene el valor 1 para un pico perfectamente simétrico y su medición es importante puesto que puede llevar a errores considerables de cuantificación, e incluso a solapar picos adyacentes de tal manera que la integración y la precisión se tornan menos confiables. Se calcula:

$$As = a+b/2a$$

Donde a y b son las medidas entre la línea que une el máximo del pico con la línea base y los extremos anterior (simétrico) y posterior del pico (con tailing) respectivamente, medidos al 5 o al 10 % de su altura.

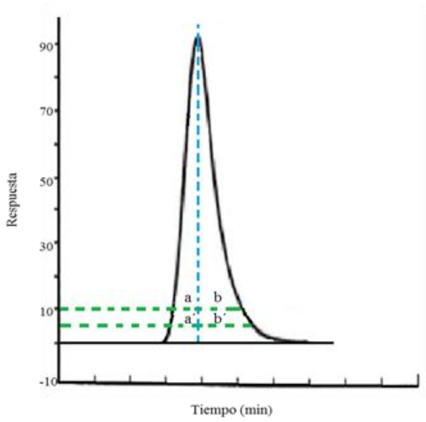


Figura 3. *Esquema de un pico asimétrico*

Ensanchamiento de la Banda Cromatográfica

Al cromatografiar una mezcla de solutos en un volumen determinado de solución, por ejemplo 20 μl, cuando la mezcla se separa y eluye de la columna, cada componente estará disuelto, no en los 20 μl originales de solvente sino en un volumen mayor, debido a que sufre diluciones a medida que avanza a través del sistema. Este fenómeno puede verse en los cromatogramas, donde

se observa claramente que los picos o bandas menos retenidos tienen mayor ancho que los más retenidos.

Este ensanchamiento de banda es normal y se conocen como ensanchamiento de banda intracolumnar. Existen sin embargo otros procesos, extracolumnares, que provocan el ensanchamiento de los picos y son producidos por factores instrumentales y experimentales.

- Ensanchamiento de banda intracolumnar

Según Van Deemter, las contribuciones al ensanchamiento de banda dentro de una columna cromatográfica son cuatro:

- Proceso multipaso
- Difusión longitudinal
- Resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil
- Resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria

❑ **Proceso multipaso:** Cuando el soluto atraviesa la fase estacionaria encontrará diversos caminos por los cuales será impulsado por la fase móvil a recorrerlos. Algunas moléculas seguirán caminos directos y otras, encontrando partículas en su paso, caminos más complejos, retrasándose respecto de las primeras. Este fenómeno se conoce también como Difusión de Eddy y su contribución al ensanchamiento de banda está dado por el diámetro de la partícula de la fase estacionaria y por una constante que depende del relleno y de la calidad de su empaquetamiento en la columna. Una reducción del tamaño de partícula de 45 a 6 µm origina una disminución de diez veces de la altura del plato teórico (H).

❑ **Difusión longitudinal:** Las moléculas de un soluto en un líquido, en este caso la fase móvil, no permanecerán inmóviles sino que difundirán en todas direcciones hasta que su concentración sea uniforme en todo el seno de líquido. Este efecto ocurre en forma evidente o imperceptible y será más notorio cuanto menor sea el caudal empleado.

La contribución de este efecto al ensanchamiento está en función inversa con la velocidad lineal de la fase móvil (µ) y en forma directa respecto del

coeficiente de difusión del soluto en el solvente y de una constante que evalúa el espacio ocupado por la fase móvil y su geometría.

- **Resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil:** El soluto se desplaza a través de la columna y sus moléculas se transferirán, por un proceso reversible, desde la fase móvil hacia la fase estacionaria y desde ésta nuevamente hacia la fase móvil.

Las moléculas de soluto más cercanas a la fase estacionaria interaccionarán mejor con ésta y las más alejadas a la inversa. Como la fase móvil está en movimiento, las moléculas más alejadas de la partícula habrán recorrido un determinado trayecto antes de que sean retenidas por la fase estacionaria, lo que resultará en una dispersión de la banda inicial.

La contribución de este efecto al ensanchamiento de banda es directamente proporcional a un factor dependiente de k', a la velocidad lineal de la fase móvil (μ) y al diámetro de la partícula, e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil.

- **Resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria:** Este efecto es semejante al anterior. Las moléculas de soluto se retienen en la fase estacionaria y son luego devueltas a la fase móvil en un tiempo finito. Las moléculas de soluto próximas a la superficie serán devueltas a la fase móvil más rápidamente que las moléculas que difundieron profundamente, lo que dará lugar a un ensanchamiento de la banda original. El ensanchamiento será proporcional al espesor de la fase estacionaria, a la profundidad del poro e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del soluto en la fase estacionaria.

La combinación de los cuatro efectos descritos da lugar a la expresión final de la ecuación de Van Deemter:

$$H = A + B/\mu + C\mu$$

Donde A, B y C son los coeficientes de difusión aparente, provocada por el proceso multipaso, difusión longitudinal y de transferencia de masa, respectivamente, y μ es la velocidad lineal de la fase móvil.

De la ecuación de Van Deemter pueden extraerse valiosas conclusiones. Se deduce una mayor eficiencia de la columna en las siguientes condiciones:

- Cuanto menor sea el diámetro de la partícula.
- Cuanto menor sea la viscosidad de la fase móvil (menor coeficiente de difusión)
- A mayor temperatura, (disminución de la viscosidad de la fase móvil)
- Cuanto mejor sea el empaquetamiento del relleno.
- Cuanto menor sea el espesor de la capa de fase estacionaria fijada al soporte de relleno.

Ensanchamiento de banda extracolumnar

Hay componentes del equipo cromatográfico que pueden ser responsables de un ensanchamiento de los picos, lo que lleva a la pérdida de eficiencia. Por esta razón es importante verificar el diseño instrumental, por ejemplo controlar el armado de longitud y tipo de tuberías, uniones, etc. Este ensanchamiento dependerá de:

- Volumen de tuberías inyector-columna y columna-celda del detector
- Volumen de inyección
- Detector: volumen y velocidad de respuesta

Ensanchamiento de banda producido por tuberías: el ensanchamiento es mayor a mayor longitud y diámetro interno de las tuberías.

Ensanchamiento de banda producido por el volumen de inyección: Se recomienda que el volumen de inyección sea pequeño, que no supere 1/6 del volumen del primer pico de interés, otros criterios son más estrictos y recomiendan un volumen no mayor de 17 µl para columnas convencionales.

De todos modos, es interesante destacar que es posible inyectar volúmenes mayores si la muestra se disuelve en un solvente más débil que la fase móvil.

Ensanchamiento de banda producido por el detector: El detector puede contribuir de dos formas al ensanchamiento de banda, en función del tubo de ingreso a la celda, volumen y geometría de la misma y en función de su componente electrónico (velocidad de respuesta).

Evidentemente el volumen de esta celda debe ser pequeño, para que no vuelva a mezclar los componentes que fueron separados en la columna.

Además del volumen de la celda debe considerarse su diseño, ya que las celdas que induzcan flujos turbulentos son capaces de producir dispersión.
La constante de tiempo (T) de un detector indica, por su parte, la velocidad a la cual éste responde a un cambio instantáneo de la concentración de analito. Si la constante de tiempo es muy alta (respuesta lenta), un pico angosto podría achatarse tanto que no se detecte ó mezclarse con otro pico adyacente. Este problema no ocurre si la constante de tiempo es muy baja (respuesta rápida).

Descripción y tipo de instrumental

Existen dos tipos de equipos de HPLC, los integrados y los modulares. En los primeros cada una de sus partes está reunida en un gabinete, lo cual proporciona un mejor aprovechamiento del espacio, menos cables, tuberías y conexiones expuestas. En los segundos, cada parte es un módulo distinto, como si fueran instrumentos individuales.
En cualquier tipo de instrumental, ya sea integrado o modular, hay ciertas características de orden general que deben ser reunidas, como ser:

- Versatilidad: el instrumental debe ser apto para resolver y trabajar con muestras de diferente tipo, debe prestarse a las distintas técnicas cromatográficas y realizar el máximo de operaciones, tales como, programación de la fase móvil, recolección de fracciones a la salida de la columna, etc.
- Rapidez: para obtener rapidez en el análisis es necesario contar con materiales de relleno de columna de alta eficiencia y que el instrumento posea adecuados sistemas de bombeo de alta presión para la fase móvil.
- Reproducibilidad y estabilidad: el instrumento debe poseer un control adecuado sobre los parámetros de operación, tales como el flujo de la fase móvil, la temperatura, presión, composición de la fase móvil, etc. y para ello debe estar provisto de controles de temperatura y flujo, sistema de bombeo de alta presión, programadores de fase móvil, detectores, etc.

- Sensibilidad: un buen instrumental además de trabajar con pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciable. La sensibilidad de todo cromatógrafo de líquidos depende sobre todo del sistema de detección que utiliza.

Componentes básicos de un equipo de HPLC

- **Recipiente para la Fase Móvil:**

Es conveniente ubicarlo algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo llenas las conexiones. Puede utilizarse un frasco de laboratorio de buena calidad, con una tapa adecuada. En el extremo del tubo de salida de solvente se conecta un filtro de acero (buzo) con 2 o 10 µm de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba.

- **Tuberías:**

Las tuberías que se utilizan para conectar los componentes sometidos a alta presión son de acero inoxidable (entre bomba e inyector, inyector y columna, columna y detector y entre detectores conectados en serie) y son de materiales poliméricos las que conectan componentes donde la presión es atmosférica o ligeramente superior (entre el reservorio de solvente-bomba, último detector-frasco de desperdicios).

Las tuberías de acero tienen un diámetro externo estandarizado: 1/16 pulgadas. Sin embargo su diámetro interno es variable, por lo cual se selecciona la de sección más fina para conectar los instrumentos por donde circula la muestra (entre el inyector y detector, de modo de no provocar dilución de la muestra) y la de sección más gruesa para conectar aquellos componentes del sistema por los que no circula la muestra, y en los cuales un diámetro interno delgado sólo aumentaría la presión del sistema.

Se debe considerar la longitud de las tuberías ya que tuberías demasiado largas conducen a ensanchamientos extracolumnares importantes, como ya

hemos visto. Las conexiones entre bomba e inyector y posteriores al detector no contribuyen al ensanchamiento de banda extracolumnar y su efecto es menos importante.

- **Uniones:**

Las uniones permiten conectar las tuberías con los distintos componentes del sistema cromatográfico. Las uniones deben reunir determinadas características, entre ellas:

- Deben ser inertes a fases móviles y muestras.
- Deben cerrar herméticamente.
- No deben contribuir en forma notable al ensanchamiento de banda extracolumnar por la presencia de volúmenes muertos.

- **Sistemas de Bombeo:**

La bomba de un HPLC impulsa la fase móvil desde el recipiente que la contiene hacia el inyector y desde allí hacia la columna. El flujo de dicha fase móvil puede ser muy variable, desde µl/min hasta ml/min.

Las bombas están construidas de materiales muy resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son:

- ✓ Presión máxima de operación, usualmente hasta 6000 psi con un sistema de corte al excederlo.
- ✓ Intervalo de volúmenes obtenibles, entre 0.1-10 ml/min (flujo).
- ✓ Características del flujo, que debe ser libre de pulsaciones, ya que generarían “ruido” y provocarían variaciones en el flujo del solvente, lo que es muy importante en el análisis cuantitativo ya que las áreas de los picos de HPLC cambian cuando varía el flujo.
- ✓ Control y reproducibilidad del caudal mejor del 0,5% relativo.
- ✓ Componentes resistentes a la corrosión.
- ✓ Facilidad para efectuar el cambio de fases móviles.
- ✓ Limpieza del sistema.

Según las características de funcionamiento y de diseño hay tres tipos de bombas mecánicas:

A) Bombas recíprocas o reciprocantes, con pistón o diafragma.

B) Bombas de desplazamiento continuo o bombas jeringas.

C) Bombas neumáticas o de presión constante

A) *Bombas Reciprocas*: En la actualidad aproximadamente el 90% de los equipos cromatográficos utilizan bombas con pistones de tipo reciprocante. Pueden ser de un solo pistón, de dos pistones, de tres pistones, bomba tándem, y bomba a pistón y diafragma flexible, de bombeo hidráulico.
Estas bombas permiten modificar el caudal entregado variando el recorrido del pistón o variando la velocidad de movimiento del pistón.
El volumen de la cámara del pistón es pequeño, normalmente entre 35-400 µl. Las fases móviles constituidas por solventes puros no causan problemas, pero las soluciones salinas (buffer fosfatos, por ejemplo) pueden producir depósitos por evaporación. Estos depósitos pueden rayar los sellos o los mismos pistones, por lo cual es recomendable lavar el sistema con un solvente apropiado luego de usarlas.

La bomba de un solo pistón es el modelo más sencillo de las bombas reciprocantes. Esta bomba impulsa a la fase móvil, por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor, en ciclos alternados de llenado y vaciado de la cámara de bombeo. En uno de los ciclos el pistón entrega el solvente contenido en la cámara y en el ciclo complementario cierra su comunicación con la columna y toma solvente del reservorio. Es evidente que cuando la bomba llena la cámara del pistón, el caudal se discontinúa. Este proceso se visualiza como un pulso originando ruido en la línea de base del cromatograma, este inconveniente puede reducirse empleando amortiguadores de pulso, engranajes excéntricos o utilizando dos o más pistones de funcionamiento sincrónico.

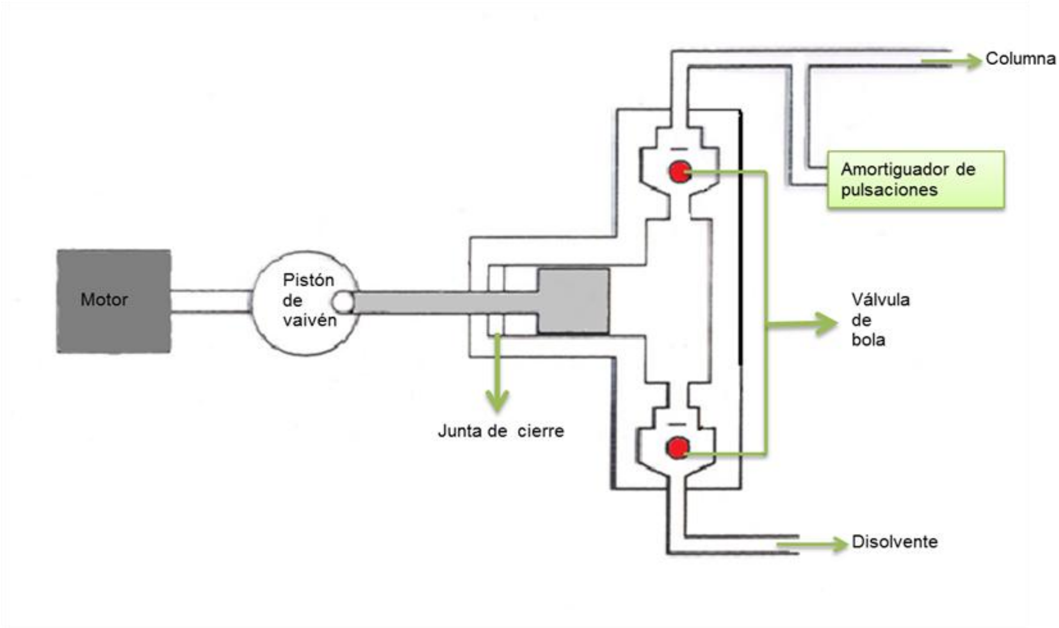


Figura 4. *Esquema de una bomba reciprocante*

B) *Bombas de Desplazamiento Continuo*: Llamadas también bombas de émbolo o de tipo jeringa porque un émbolo desplazado en forma continua, por un mecanismo de tornillo accionado mediante un motor de pasos, comprime un líquido en una cámara obteniéndose un flujo de volumen constante, uniforme y continuo, es decir, libre de pulsaciones, pero la capacidad de la bomba es limitada, aproximadamente 250 ml, y para rellenar la cámara es necesario suspender momentáneamente la operación.

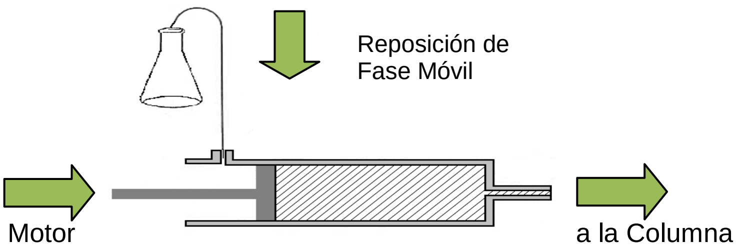


Figura 5. *Bomba Jeringa*

C) *Bombas Neumáticas*: En estas bombas la fase móvil se encuentra en un contenedor plegable colocado en un recipiente que puede presurizarse

mediante gas comprimido. No provocan pulsaciones aunque tienen una limitada capacidad y presión de salida, menores a 2000 psi, además el caudal depende de la viscosidad del solvente y no pueden utilizarse en la elución con gradiente.

- **Sistemas de Inyección:**

Son válvulas que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no, según su posición, a través de un loop en el cual se introduce la solución a inyectar (figura 6). Las válvulas pueden accionarse manual o automáticamente.

Poseen un cuerpo fijo, un rotor con un sello que gira y un loop externo, intercambiable, con volúmenes entre 5-500 µl, que contiene la muestra. También existen válvulas de inyección de micromuestras, con loops de volúmenes entre 0,5-5µl. Los inyectores automáticos deben poseer además un carrusel que aloja viales donde se coloca las muestras a inyectar.

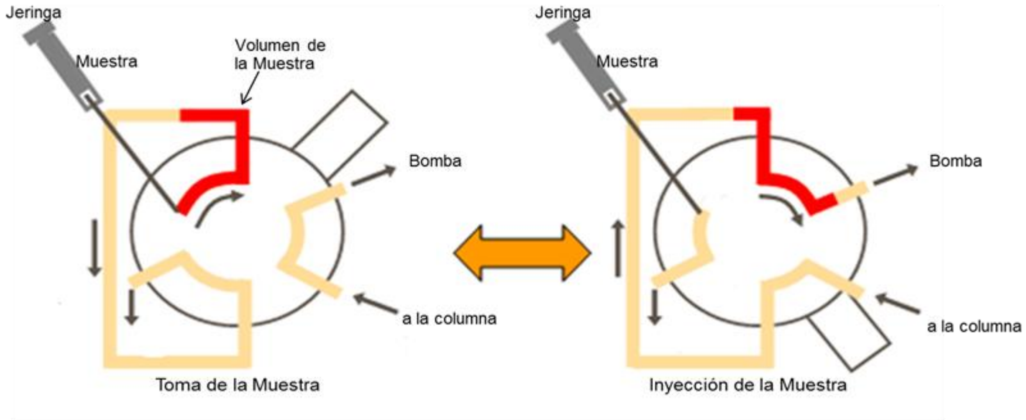


Figura 6. *Válvula de inyección*

- **Programadores de Fase Móvil:**

Se utilizan para cambiar la composición de la fase móvil conforme transcurre el análisis. Por lo general se utilizan dos disolventes de diferente polaridad y se varía el porcentaje del disolvente más polar en la mezcla binaria. Las ventajas que ofrece esta técnica son: análisis más rápidos, mejores separaciones, mayor simetría en los picos y mejor detectabilidad.

La elución isocrática (composición constante de la fase móvil) en algunos casos insume mucho tiempo y la forma de las señales no es muy buena, en cambio la separación por gradiente es rápida y las señales son simétricas.

Hay programadores de dos clases:

1. **Gradientes de baja presión** o programadores que efectúan el mezclado en una cámara, después de lo cual el líquido pasa a la bomba, la que envía la mezcla a la columna.

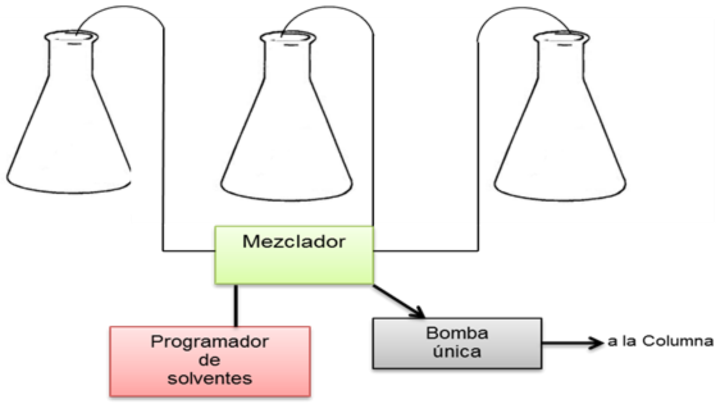


Figura 7. *Sistema de formación de gradiente de baja presión*

2. **Gradientes de alta presión** ó programadores de mezclado en corriente. Requieren dos bombas, que por lo común son del tipo de desplazamiento continuo y desplazan cantidades determinadas de cada líquido, lo que permite generar cualquier forma de gradiente**.** El uso de microprocesadores permite hoy día emplear los generadores de gradientes en forma automática.

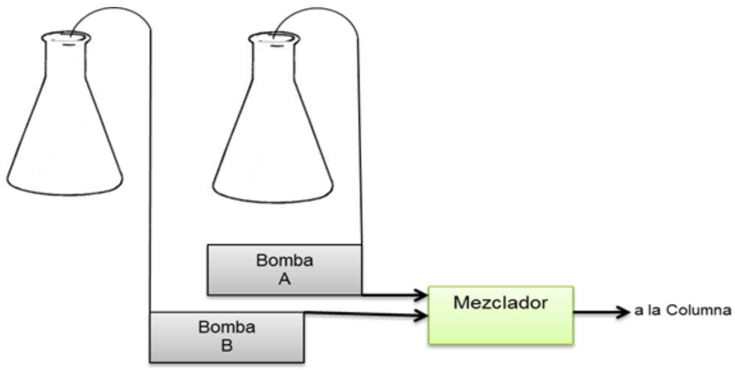


Figura 8. *Sistema de formación de gradiente de alta presión*

- **Detectores:**

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

El detector ideal será aquel que satisfaga los siguientes requisitos: alta sensibilidad, estabilidad, lectura continua y respuesta universal. El detector debe poseer un dispositivo que mida en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene y que genere una señal proporcional a la concentración de la muestra, a medida que esta sale de la columna.

Al considerar un detector en términos de su aplicación a un cierto problema, deben tenerse en cuenta algunas propiedades generales tales como:

- Respuesta: Puede ser universal o selectiva, según la capacidad que tenga el detector de trabajar con todo tipo de muestras o solo con una específica. En general, los detectores universales son más deseables, si bien los selectivos, que suelen ser más sensibles, efectúan mejor el análisis de muestras complejas porque detectan ciertos componentes a muy bajas concentraciones.
- Sensibilidad: Se define la sensibilidad de un detector como la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal. Este es un término relativo puesto que a partir de un mismo detector, la señal obtenida puede ser muy diferente para diversas muestras.
- Ruido: Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y que puede ser producida por fallas electrónicas, variaciones de flujo ó temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire atrapadas en el detector, etc.
- Linealidad: Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra, esta propiedad se conoce como linealidad. El intervalo lineal de un detector se puede definir como la diferencia entre las concentraciones máximas y mínimas respecto a las cuales la respuesta del detector es lineal.

- Estabilidad: Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo y ser compatible con programaciones de fase móvil.

Tipos de detectores

- **Detector de Índice de Refracción:**

Mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es decir, es un detector basado en una propiedad de la disolución, pues responde a una propiedad de la fase móvil que se modifica por la presencia de un analito. Es un detector universal, ya que es imposible que el índice de refracción del soluto sea similar al del solvente y además no es destructivo. Sin embargo es muy poco sensible, lo cual limita su campo de aplicación y es muy afectado por los cambios de temperatura. No puede utilizarse con gradiente de fase móvil porque el cambio de composición de la misma se acompaña con un cambio de su índice de refracción y entonces no puede estabilizarse la línea base.

- **Detector UV:**

Es el detector más utilizado en HPLC. En este caso, es un detector basado en una propiedad del soluto, como es la de absorber al UV, que no es propia de la fase móvil. Es muy sensible y posee un rango lineal, permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de fase móvil. Es un detector muy poco sensible a los cambios de flujo y de temperatura.

Existen tres tipos de detectores UV: de longitud de onda fija y de longitud de onda variable y de ordenamiento de fotodiodos.

El primero de ellos es el más simple, trabaja a longitudes de onda fijas, especialmente a 254 nm, aunque pueden encontrarse detectores que lo hagan a otras longitudes de onda. El detector de onda variable o espectrofotométrico, es simplemente un espectrofotómetro en el cual se reemplaza al compartimiento de cubetas por una celda de flujo. Permite seleccionar

libremente la longitud de onda de trabajo y en los equipos más modernos pueden elegirse 1,2 ó más longitudes de onda, obteniéndose cromatogramas superpuestos a cada una de ellas.

El detector de ordenamiento de fotodiodos, posee una distribución distinta de la red de difracción, se emplea un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con luz “blanca”, es decir, no monocromatica y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocélula se emplea un conjunto de fotocélulas o fotodiodos montados en un chip de silicio. De esta forma, se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real. Una de las formas de presentación de los datos espectrales que resulta útil para la identificación de las especies y para elegir las condiciones de la determinación cuantitativa, consiste en un gráfico tridimensional. Para poder controlar y procesar toda la información es necesario la presencia de una computadora con el software adecuado.

Es el detector ideal para realizar el desarrollo de métodos analíticos por HPLC, ya que permite asegurar, dentro de ciertos límites, la integridad y pureza de un pico cromatográfico.

- **Detector de Fluorescencia:**

Utilizado en el análisis de sustancias que presentan fluorescencia natural u obtenida por derivatización con un reactivo fluorogénico. Es de muy alta sensibilidad y selectividad por lo cual es muy adecuado para el análisis de trazas. La selectividad se debe a que existen pocas sustancias fluorescentes y además las reacciones de derivatización implican la presencia de un grupo funcional derivatizable en la molécula del analito, lo cual no es siempre posible. La fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación.

- **Detector Electroquímico:**

Es mucho más sensible que el detector UV además de ser altamente selectivo, ya que no sólo detecta compuestos capaces de ser oxidados y reducidos, sino que puede seleccionarse el potencial aplicado, con lo cual se reducen los compuestos detectables. Se basan en cuatro métodos electroanalíticos que

incluyen la amperometría, la voltamperometría, la coulombimetría y la conductimetría.

Otros detectores:

- De absorbancia en el Infrarrojo
- De Dispersión de luz
- Detectores de espectrometría de masas

Fase Móvil

No todos los solventes son adecuados para trabajar en HPLC. Un solvente apropiado para HPLC debe cumplir con algunos requisitos, por ejemplo:

- Solubilizar bien las muestras
- No degradar o disolver la Fase Estacionaria
- Poseer baja reactividad
- Ser compatible con el detector utilizado
- Poseer baja viscosidad
- Ser seguro
- Tener alto grado de pureza

La muestra a inyectar debe estar completamente disuelta. Es conveniente que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil. Si esto no es posible, debe tenerse en cuenta tanto la miscibilidad entre el solvente de disolución y la fase móvil, como la precipitación de componentes de la muestra al estar en contacto con la fase móvil.

Los solventes muy reactivos no se utilizan en HPLC, ya que pueden reaccionar con la muestra, la fase estacionaria, o los componentes del equipo cromatográfico.

Si se tiene en cuenta que el detector más usado es el espectrofotométrico, debe usarse un solvente transparente a la longitud de onda de trabajo. Para ello es muy útil conocer la *longitud de onda de corte* (λ_c) o sea la longitud de onda a la cual la absorbancia del solvente, en una cubeta de 10 mm de paso

óptico, es igual a 1 unidad de absorbancia usando aire como referencia. Es decir, si un solvente tiene una longitud de corte de 254 nm no se puede usar a λ menores, pero sí a mayores λ. Solventes como el tolueno (λ_c: 285 nm) y acetona (λ_c:330 nm) prácticamente no se emplean, ya que la señal de fondo que producen en un detector convencional es muy alta y por lo tanto impide la medición de los compuestos eluidos. En cambio el metanol (λ_c: 205 nm) y el acetonitrilo (λ_c: 190 nm) son los solventes más empleados en HPLC.

La viscosidad de los solventes está estrechamente relacionada con la presión del sistema. Con los solventes viscosos, la eficiencia de la separación es menor debido a que el coeficiente de difusión de la muestra se reduce, y se dificulta la transferencia de masa del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. A mayor viscosidad mayor presión en el sistema, por eso se prefiere evitar el uso de solventes de alta viscosidad como dimetilsulfóxido o isopropanol.

Como en cualquier método analítico, en HPLC debe evitarse el empleo de solventes que por sus características (en particular inflamabilidad y toxicidad), representan un serio riesgo para el operador.

La presencia de impurezas puede producir una señal de base importante en el detector. A veces no es posible obtener comercialmente un solvente de buena pureza. En estos casos pueden emplearse solventes de menor calidad, pero se recomienda una purificación previa.

Preparación de la fase móvil:

Hay que tener en cuenta la posible contracción de volumen, que se produce al mezclar solventes muy polares. Esta alteración en la composición de la fase móvil puede modificar los tiempos de retención de los analitos provocando la superposición de picos que en condiciones apropiadas serían separados.

La fase móvil luego de preparada, debe ser filtrada y desgasificada. La filtración se efectúa por medio de membranas de 0.45 μm de porosidad, en equipos de filtración adecuados. Las soluciones a inyectar también deben filtrarse a través de membranas semejantes a las empleadas para la fase móvil. Si la cantidad

de muestra es muy pequeña, se puede reemplazar la filtración por la centrifugación.

Los gases disueltos en la fase móvil pueden producir varios inconvenientes, entre ellos: liberación de burbujas en el cabezal de la bomba, liberación o formación de burbujas en la celda del detector, que se verán como señales en el cromatograma y afectarán la estabilidad de la línea de base. Los métodos que habitualmente se emplean para la desgasificación de la fase móvil son: calentamiento, ebullición a reflujo, burbujeo de un gas inerte, vacío y ultrasonido.

El valor del pH de la fase móvil puede ser un parámetro crítico en la retención de solutos ionizables y en algunos casos, debe controlarse rigurosamente. A valores de pH mayores a 7,5 se disuelve la sílice de base de las columnas, y a pH menores a 2 se hidroliza la unión entre la sílice y la fase enlazada.

Columnas

En todo sistema cromatográfico, ya sea en fase líquida ó gaseosa, la columna es el corazón del sistema puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la mezcla en estudio.

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. De entre todos los materiales, el acero inoxidable es el más usado. Las paredes internas deben tener una superficie finamente pulida pues se ha observado que posee una cierta influencia sobre la eficacia de la columna.

La longitud de la columna se encuentra entre 10 y 50 cm, aunque puede ser bastante más larga, en especial en cromatografía de permeación donde se suele usar varias columnas conectadas una detrás de otra. El diámetro en la mayoría de los casos es de alrededor de 3-4 mm.

Tal vez la columna más frecuentemente utilizada con fines analíticos sea la de 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, empaquetada con partículas de 5 µm, que pueden tener de 40000 a 60000 platos/metro. Recientemente han

aparecido columnas con 1-4,6 mm de diámetro interno, rellenas con partículas de 3-5 µm y longitud entre 3-7,5 cm, con 100000 platos/metro, presentando la ventaja de la rapidez y el mínimo consumo de solventes.

Si se desea realizar trabajos de tipo preparativos, o sea separar y recuperar los componentes de una muestra en cantidad suficiente para poder utilizarlos posteriormente, se debe recurrir a columnas con dimensiones mayores. Dichas columnas efectuarán la separación en forma más lenta y con una eficiencia menor que una columna de diámetro pequeño.

Respecto a la forma o geometría de la columna, por regla general, se prefieren las rectas a las de cualquier otra forma, sobre todo porque hay cierta pérdida de eficiencia cuando se doblan las columnas.

Las conexiones entre columnas, así como entre la columna y el detector o el inyector deben ser herméticas. En los extremos de la columna se coloca un disco de teflón o metal poroso para evitar que el relleno de la columna se afloje o pierda, es necesario que este disco o tapón retenga las partículas del relleno sin producir una caída de presión muy grande.

En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna, se coloca delante una pre-columna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los solventes. Su relleno debe ser semejante al de la columna analítica con tamaños de partículas mayores para minimizar la caída de presión.

La mayoría de los equipos llevan hornos para las columnas que controlan la temperatura de las mismas, cuando es necesario trabajar a una temperatura estricta.

El material de relleno de las columnas se denomina Fase Estacionaria y se detalla a continuación.

- **Fase Estacionaria:**

El material ideal será aquel que en el menor tiempo posible dé la mejor resolución para la separación de la mezcla, tenga la máxima capacidad de muestra, produzca caídas de presión pequeñas y que además sea de costo reducido, por supuesto que no existe un material con todas estas propiedades y a veces se justifica sacrificar algunas ventajas para obtener otras.

Los materiales que se utilizan son:

Materiales porosos, cuyas partículas sean de tamaño menor a 40 µm (silicagel y alúmina)

Adsorbentes peliculares, también conocidos con el nombre de adsorbentes de capa porosa, de porosidad superficial o de centro sólido. Consisten en partículas esféricas, generalmente vítreas, no porosas, recubiertas de una capa muy fina de un adsorbente, como silicagel o alúmina. El espesor de esta capa es de alrededor de 1 µm.

Estos dos tipos de materiales tienen cosas en común pues ambos pueden utilizarse en cromatografía líquido-sólido, o bien pueden recubrirse de alguna fase líquida y utilizarse en cromatografía líquido-líquido. Asimismo se pueden unir químicamente en su superficie a compuestos polares o no y transformarse en una fase químicamente unida o ligada. De los materiales de fase químicamente unida los de más uso son los que contienen el grupo octadecilo, no polar, RP-18 o C_{18}, lo cual equivale a decir que la cromatografía de fase inversa ó reversa es quizás la más popular.

Materiales para cromatografía de intercambio iónico, son resinas porosas que consisten en partículas rígidas del copolímero estireno-divilbenceno en cuya superficie y poros se encuentran los grupos intercambiadores de iones.

Intercambiador de iones peliculares o resina pelicular, consisten en partículas vítreas de forma esférica recubiertas de una capa muy fina del copolímero estireno-divinilbenceno, las cual contiene los grupos activos.

Materiales porosos de silicagel con grupos intercambiadores químicamente unidos, tienen la ventaja de resistir presiones elevadas y poseer una capacidad de intercambio superior a la de los materiales peliculares.

Los grupos presentes en todo tipo de resinas de intercambio iónico suelen ser $–NR_4^+$ y $–NH_2$, en el caso de resinas de intercambio aniónico, que se obtienen comercialmente en forma de cloruros y $–HSO_3$ en el caso de resinas de intercambio catiónico, que se adquieren en forma de sales de sodio.

Materiales para cromatografía de exclusión molecular, varían de acuerdo con su rigidez y con el intervalo de pesos moleculares dentro del cual son

útiles, es decir, el material a utilizar en la columna dependerá del tamaño de las moléculas que se deban analizar. El intervalo de pesos moleculares dentro del cual es útil un material está determinado por dos límites, uno inferior, llamado *límite de permeación*, por debajo del cual todas las moléculas de menor tamaño son igualmente difundidas dentro de los poros del material y otro límite superior, *límite de exclusión,* por encima del cual todas las moléculas de mayor tamaño son demasiado grandes para penetrar los poros. Moléculas de tamaño intermedio entre ambos límites serán total o parcialmente separadas de acuerdo con la selectividad característica de cada material. Es obvio que moléculas más pequeñas que el límite de permeación ó más grandes que el límite de exclusión serán eluidas de la columna sin resolución.

Entre este tipo de materiales encontramos a los *materiales blandos*, que son geles de polidextranos y poliacrilamidas, utilizados casi siempre con disolventes acuosos, su capacidad es elevada y no resisten presiones superiores a 60 psi. Los límites de pesos moleculares en los cuales se pueden utilizar varían desde 100 hasta 200.000. Como ya se ha mencionado la técnica que utiliza este tipo de materiales se denomina Cromatografía de filtración y se aplica a biopolímeros.

Los *materiales semirígidos ó geles macroporosos*, usados en análisis de olefinas, resisten presiones del orden de 900 psi, son por lo general microesferas de algún copolímero, como el poliestireno-divinilbenceno. Se emplean sólo con disolventes acuosos. Los límites de pesos moleculares en los cuales se pueden utilizar varían desde 100 hasta 1.000.000.

Los *materiales rígidos*, se utilizan a cualquier presión y son generalmente partículas de sílice porosa o vidrio poroso. A causa de su rigidez se pueden obtener separaciones muy rápidas a flujos de fase móvil acuosa, o no acuosa, sumamente altos, lo cual requiere presiones elevadas. Los límites de pesos moleculares en los cuales se pueden utilizar varían desde 100 hasta 1.000.000; se aplica a muestras de proteínas y polisacáridos.

Preparación de la muestra

Esta etapa es sumamente importante sobre todo cuando la matriz que rodea al analito es muy compleja. La selección del método más apropiado depende de muchos factores, como ser:

- *Propiedades físicoquímicas del analito*. Es conveniente conocer su estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedades ácido-base (pKa) y respuesta frente al tipo de detector seleccionado.
- *Concentración del analito en la muestra.* Para analitos en altas concentraciones, en general se requieren preparaciones de muestras sencillas como la solubilización y filtración. Analitos en bajas concentraciones, pueden requerir metodologías más complejas.
- *Naturaleza de la matriz de la muestra.* Los componentes de la matriz pueden interferir en la detección del analito. Hay que conocerlos para saber cómo preparar la muestra.
- *Forma en la que se presenta el analito en la muestra.* Es necesario conocer el estado en el que se encuentra el analito en la muestra. En muestras de origen biológico el analito puede no encontrarse como tal, sino unido a proteínas transportadoras, como metabolito, etc.
- *Compatibilidad de los medios de solubilización con el sistema cromatográfico.* La solución a inyectar debe ser compatible y miscible con la fase móvil.
- *Tipo de detector.* Los detectores poco selectivos como el de índice de refracción generalmente requieren muestras mucho más limpias que los detectores más selectivos como el de fluorescencia.
- *Compatibilidad con el detector.* No es conveniente utilizar solventes como la acetona o el tolueno si se ha de emplear un detector UV porque estos solventes poseen una elevada absorción de base y pueden producir picos espúreos o señales importantes en el frente del solvente.

Es decir que cada muestra deberá ser preparada en forma apropiada para reducir interferencias y aumentar la vida de la columna.

En los casos más simples, por ejemplo si la muestra es líquida, quizás solamente se necesite inyectarla directamente, previa filtración, en cambio si es un sólido es necesario pulverizarlo y homogeneizarlo apropiadamente y luego solubilizarlo en un solvente adecuado.

En cambio, hay muestras que necesitan pasar por un proceso de *desproteinización* previo a la inyección en el cromatógrafo, por ejemplo las muestras biológicas. Este proceso se puede realizar agregando alguno de estos agentes: solventes orgánicos, como el metanol, acetonitrilo o etanol, sales neutras, ácidos, como el túngstico, tricloroacético, perclórico, metafosfórico, cationes del tipo Hg^{2+}, Cd^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+} y Zn^{2+} o bien por ultrafiltración. En muchos casos durante la desproteinización se produce una pérdida de analito por adsorción al precipitado lo que acarrea bajas recuperaciones, es decir baja exactitud analítica. Este efecto puede minimizarse controlando apropiadamente las condiciones en las que se realiza la desproteinización y agregando la solución muestra al agente desproteinizante y no el agente desproteinizante a la solución muestra.

Puede ser necesario una *extracción líquido-sólido*, también llamada lixiviación, que consiste en la solubilización del analito, presente en una muestra sólida previamente molida, con un solvente adecuado, con la ayuda de agitación, manual, mecánica o ultrasónica. Un tipo especial de extracción líquido-sólido emplea sistemas continuos con solventes calientes (Soxhlet) y se aplican a analitos poco solubles o a matrices muy complejas.

La *extracción líquido-líquido* también puede ser utilizada en algunas ocasiones, para preparar una muestra antes de cromatografiarla, si bien la extracción convencional es una operación lenta, tediosa y está expuesta a numerosos problemas: formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de solventes tóxicos e inflamables, peligro en evaporaciones finales, etc.

En todos los casos la muestra deberá filtrarse antes de inyectarse al equipo, ya que tanto las muestras como los estándares deben estar totalmente libres de partículas en suspensión. La filtración de las muestras se realiza con dispositivos desmontables o fijos que contienen membranas de 0.45 ó 0.22 μm

de un material apropiado, seleccionado de acuerdo a su resistencia frente al solvente de disolución de las muestras.

Existe un proceso de *extracción denominado en Fase Sólida*, que utiliza columnas o cartuchos de extracción, de suma utilidad cuando las muestras son muy complejas y cuando la concentración del analito es muy baja, ya que permiten aumentar su concentración. Consiste en una extracción líquido-sólido a través de una pequeña columna ó cartucho de plástico (usualmente polipropileno), relleno con cantidades variables (desde 100 hasta 500 mg) de distintos materiales similares a los empleados para el relleno de las columnas de HPLC, pero de mayor granulometría.

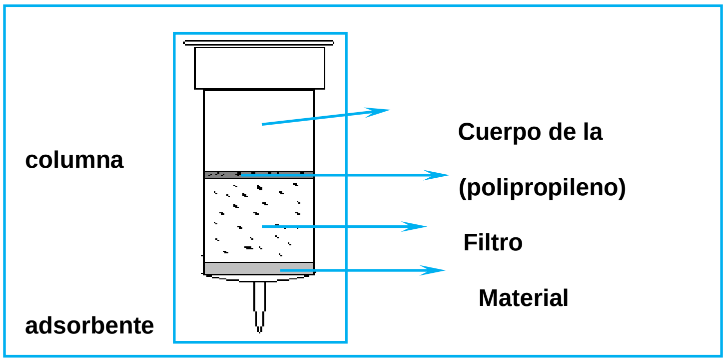


Figura 9. *Esquema de un cartucho de extracción en fase sólida*

Los materiales que se emplean para el relleno comprenden desde adsorbentes muy polares como la silica, hasta muy poco polares como una fase ligada de RP-18, incluso también materiales de intercambio iónico.

La extracción en fase sólida tiene lugar mediante mecanismos de sorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo de las columnas.

La selección de las condiciones óptimas para la extracción depende de la naturaleza del analito y de la matriz que lo rodea.

En primer lugar se debe lavar el cartucho para eliminar la sustancias provenientes de muestras anteriores que pudieran quedar retenidas en la columna, esto se realiza fluyendo metanol u otros solventes menos polares como acetonitrilo o tetrahidrofurano. Luego debemos activar la columna, para solvatar los grupos funcionales del material de relleno de la columna, en fase reversa la activación se suele realizar percolando aproximadamente dos

volúmenes de columna de agua o buffers acuosos. A continuación se agrega lentamente la muestra en la columna, utilizando un caudal determinado (1 a 10 ml/min). Esta operación puede efectuarse aplicando directamente la solución a inyectar de manera tal de lograr la elución del analito y la retención de impurezas cuyo comportamiento sea muy afín a la columna. Otra forma es mediante la retención del analito en la columna utilizando un solvente débil, en general seguido de un lavado con un solvente con el cual no eluya el analito y posteriormente eluirlo con un solvente fuerte. Este método es el más habitual y puede utilizarse para la preconcentración de muestras, pasando a través de la columna un volumen mayor de muestra y luego eluyendo con poco volumen de solvente.

Una vez aplicada la muestra deben eliminarse las impurezas retenidas en el paso anterior utilizando un solvente relativamente débil con el cual el analito no eluye. Finalmente el analito se eluye con un solvente tal que posea la fuerza de elución apropiada utilizando para ello desde 5 hasta 20 volúmenes de columna.

Esta etapa puede realizarse impulsando el solvente con la ayuda de una jeringa o aspirarlo con vacío. En todo momento las columnas deben mantenerse húmedas y no dejar que se sequen para obtener una buena recuperación del analito. Existen cámaras especialmente diseñadas para efectuar todas las operaciones citadas, para ello se colocan varias columnas juntas de manera tal que es posible procesar varias muestras en forma simultánea. En muchos casos las columnas pueden reutilizarse dependiendo de la naturaleza de los componentes de la matriz y de las condiciones de lavado.

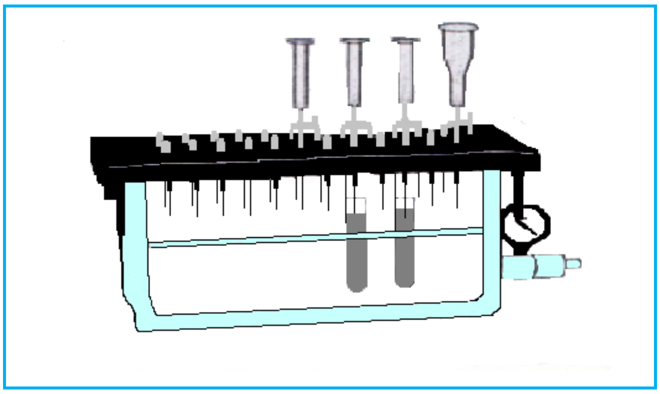


Figura 10. *Esquema de una cámara para extracción en fase sólida*

Dentro de las metodologías no convencionales de preparación de muestras podemos citar a la denominada cromatografía de *intercambio de columnas* (column- switching). Esta técnica se pudo aplicar gracias a la aparición de válvulas apropiadas, con bajos volúmenes muertos y capacidad para operar a altas presiones. Estas válvulas están construidas de acero inoxidable, soportan presiones de hasta 6000 psi y se accionan electrónicamente, automatizando el proceso de intercambio de columnas. Además existen válvulas de intercambio de solventes que operan a bajas presiones, construidas de teflón y que se usan en combinación con las de alta presión para las metodologías de intercambio de columnas donde se seleccionan distintos solventes, y también se utilizan solas para lavar las columnas, recolectar fracciones o purgar las celdas de referencia de los detectores.

La cromatografía de intercambio de columnas comprende varios modos diferentes de operación, entre ellos la selección de columnas, que combinada con algún dispositivo que permita el cambio automático de solventes como las válvulas de intercambio de baja presión, permite cambiar automáticamente las columnas y los solventes. Otra aplicación es en la operación en contracorriente, utilizada para solucionar los problemas que producen algunos compuestos muy afines al material de relleno de las columnas que se retienen fuertemente y no eluyen en las condiciones de operación habituales y deben removerse diariamente con el lavado. Quizás la aplicación más frecuente de estos métodos sea la preparación de la muestra en la misma línea del cromatógrafo en forma automática (clean-up online) que puede efectuarse con la combinación apropiada de una válvula, un guardacolumna y una columna analítica. Fundamentalmente estas preparaciones comprenden la retención del analito utilizando una fase móvil débil en un guardacolumna o columna secundaria, el lavado de la misma, y la elución posterior utilizando un solvente más fuerte.

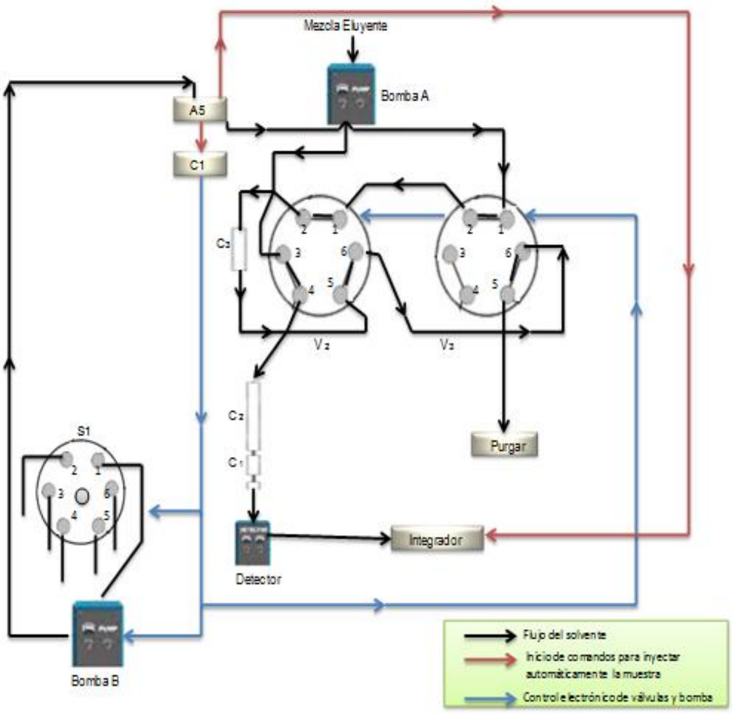


Figura 11. *Esquema de un intercambio de columna para clean-up de muestras*

Son también sumamente aplicados los métodos de enriquecimiento que comprenden un proceso de concentración del analito en el mismo equipo cromatográfico seguido de alguna modalidad de preparación de las muestras. Pueden utilizarse sistemas similares a los indicados para la preparación de las muestras en la figura 11 con la diferencia que el volumen de muestra introducido es mucho mayor.

Otro procedimiento que se suele aplicar antes de cromatografiar una muestra es la *derivatización* que se refiere a la reacción química que se produce entre el analito y un reactivo determinado, ya sea dentro o fuera del equipo cromatográfico. Si se efectúa antes de inyectar la muestra en el cromatógrafo, la derivatización se denomina precolumna y los derivados ya formados se separan en la columna cromatográfica.

Una de las mayores ventajas de la *derivatización pre-columna* reside en el hecho que no existen limitaciones en cuanto a la cinética de la reacción, es decir, que puede esperarse todo el tiempo que sea necesario como para

completar la reacción sin ningún perjuicio en el resultado cromatográfico. Además, puede utilizarse un gran exceso de reactivo que puede eliminarse en un paso previo o separarse en la misma corrida cromatográfica. La mayor desventaja de los sistemas pre-columna reside en la posible aparición de picos espúreos provenientes de derivados no deseados.

También puede realizarse la derivatización después de inyectar la muestra, en cuyo caso se denomina post-columna. La *derivatización post-columna* comprende la reacción química del analito en el mismo equipo de HPLC. Esta reacción se realiza después de la separación cromatográfica en dispositivos denominados reactores. En la figura 12 se esquematiza un equipo de HPLC para operar con derivatización post-columna. Este instrumento consta de los módulos habituales de un cromatógrafo convencional, conjuntamente con los módulos necesarios para realizar la reacción de derivatización en la línea del instrumento. En primer lugar se necesita una bomba para bombear el reactivo hacia el eluyente de la columna. Esta bomba opera en la zona de baja presión del instrumento por lo cual no necesita ser de alta presión. En segundo lugar se necesita un dispositivo en el cual pueda mezclarse íntima y rápidamente el líquido eluyente de la columna, este dispositivo se denomina mezclador y un reactor donde los analitos puedan reaccionar a temperatura controlada con el reactivo derivatizante.

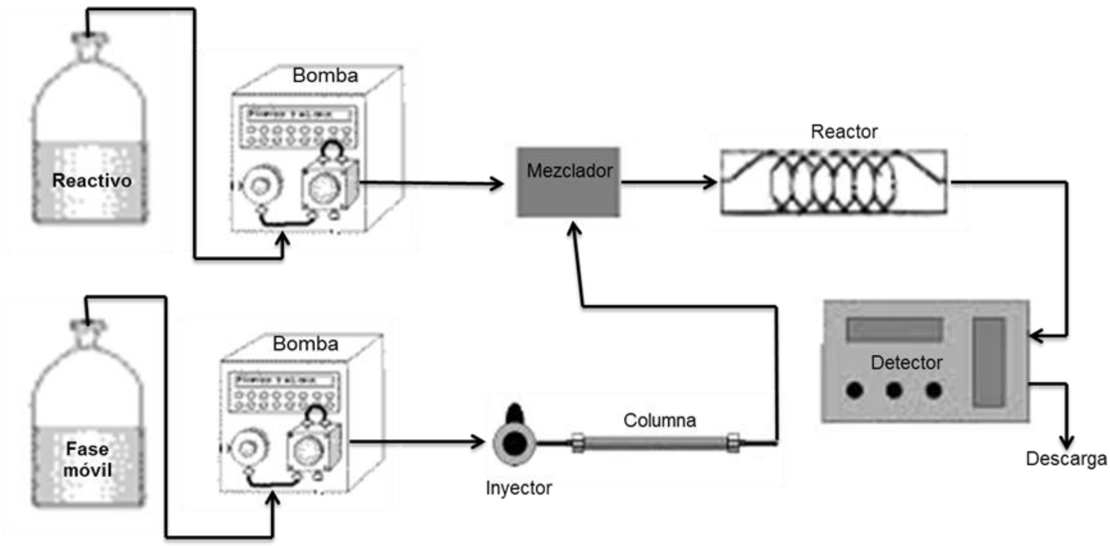


Figura 12. *Esquema de un equipo de HPLC para operar con derivatización post columna*

Para aplicar un método de análisis por derivatización post-columna de las muestras se debe conocer el tiempo necesario para completar la reacción. Las reacciones rápidas pueden realizarse con reactores que permitan tiempos de estadía cortos, mientras que las lentas requieren la utilización de reactores que permitan mayores tiempos de estadía. En general no es necesario que la reacción alcance su punto máximo, y puede operarse sin dificultad con reacciones incompletas. Esto se debe a que la detección se realiza siempre al mismo tiempo, aunque no se complete en su totalidad.

La elección de un método de derivatización pre o post-columna depende principalmente de la velocidad de la reacción y de la compatibilidad de la reacción (y los reactivos) con la fase móvil empleada.

Los motivos por los que se recurre a la derivatización pueden ser, en primer lugar para *mejorar la detección,* debido a la falta de detectores universales que posean la sensibilidad adecuada. Muchos compuestos que no poseen grupos cromóforos o fluoróforos no pueden ser detectados mediante un detector de UV o de fluorescencia, como por ejemplo los ácidos grasos y los aminoácidos. Estas sustancias deben derivatizarse para poder detectarse por HPLC. Existen diversos reactivos de derivatización dirigidos al grupo amino o al carboxilo. Habitualmente se derivatiza el grupo amino para producir derivados fluorescentes. Otro motivo por el cual se recurre a la derivatización es para *mejorar la selectividad*, en este caso le utiliza para separar compuestos, que de otra manera, o bien no se pueden separar o bien la separación resulta muy compleja. Si bien la derivatización para mejorar la selectividad no es frecuente en HPLC, dado que una adecuada combinación de fases estacionaria y móvil puede resolver sin dificultades la mayoría de las preparaciones, existe un caso especial que se refiere a la separación de isómeros ópticos. Como los enantiómeros no poseen propiedades diferentes entre sí, salvo las que se refieren a su comportamiento frente a la luz polarizada, difícilmente puedan separarse por algún sistema cromatográfico. En este caso, y para lograr la separación, los enantiómeros se derivatizan con reactivos estereoespecíficos para formar los correspondientes diasteroisómeros, siendo estos últimos,

sustancias más simples de ser separadas. Se puede usar Fase Estacionaria ó Fase móvil quiral, o combinar ambas.

Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo por medio de HPLC es tan confiable como el realizado por cromatografía de gases. Etapas del análisis cuantitativo:

1. Muestreo.
2. Preparación de la muestra
3. Inyección de la muestra
4. Separación cromatográfica
5. Detección
6. Integración de la señal
7. Cálculo de la concentración del analito

Los puntos 1, 2, y 3 ya fueron oportunamente tratados.

4. *Separación cromatográfica*: Puede ser la fuente de muchos errores debido a múltiples factores. Por ejemplo puede haber descomposición del analito o interacción del analito con el instrumento, por ejemplo adsorción irreversible de los componentes de la muestra en la columna, ya sea por efecto de la fase móvil o del material de relleno de la columna, o también pueden ser errores asociados a la separación en sí misma. Para minimizar estos últimos errores se deben controlar los parámetros cromatográficos descriptos con anterioridad: factor de capacidad (k'), tailing y resolución (R).

5. *Detección*: La sensibilidad, estabilidad, linealidad y especificidad del detector son muy importantes. El tamaño de la muestra debe estar dentro del intervalo lineal del detector, los cambios de flujo, de temperatura y las fallas electrónicas pueden afectar las características de la respuesta del detector, por otra parte el detector puede ser completamente ciego a un determinado tipo de muestra o

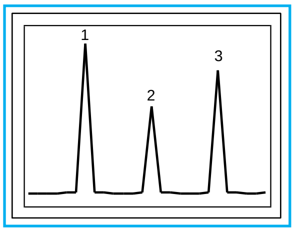
bien su sensibilidad variar para compuestos de diferente estructura. Por estas razones se recomienda tener cuidado al interpretar los resultados.

6. *Integración de señales*: Se lleva a cabo por diversas técnicas que varían en cuanto a complejidad y exactitud. El propósito de esta etapa es transformar de alguna forma la intensidad de las señales emitidas por el detector en medidas que puedan relacionarse con la cantidad de muestra. La señal generada por el detector se transmite a integradores que transforman la señal analógica en digital, calculan el área o altura de los picos y efectúan una serie de operaciones programadas generando finalmente un reporte analítico.

7. *Cálculo de la concentración de analito*: Se lleva a cabo por alguno de los siguientes métodos:

a) *Normalización Interna ó Estandarización Interna.* Relaciona las áreas obtenidas con el % de composición de la mezcla.

$$\%A_1 = \frac{A_1}{AreaTotal} \times 100$$



Esta técnica requiere que todos los componentes de la mezcla sean separados y que la respuesta del detector sea igual para todos ellos, condición ésta que por lo común no se cumple y que da lugar a que la normalización de áreas lleve implícito el uso de factores de corrección ó de respuesta.

b) *Calibración Externa ó Estándar Externo*. Es el método de cuantificación más utilizado en HPLC. Consiste en la preparación de estándares de concentración aproximadamente igual al analito en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambas, muestra y estándar, en las mismas condiciones operativas. La concentración de analito en la mezcla se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia, es decir:

$$P = \frac{A_m \cdot C_s}{A_s} \times D \times 100$$

Donde P = % analito en la muestra

A_m y A_s = áreas de la muestra y de estándar

C_s = concentración del estándar

D = factor de dilución

c) *Estándar Interno*. Consiste en agregar cantidades iguales y exactamente medidas de la solución de una sustancia así denominada, tanto a la muestra como a un estándar de referencia del analito. Para determinar la concentración de analito en la muestra se calcula la relación de áreas de analito a estándar interno tanto en la muestra como en el estándar y se efectúa el cociente entre ambas, es decir:

$$P = \frac{R_m \cdot C_s}{R_s} \times D \times 100$$

Donde R_m y R_s son las relaciones de área de analito a estándar interno en la muestra y el estándar respectivamente.

Este método no es sensible a los errores de inyección debido a que estos errores se compensan al utilizar relaciones de áreas.

La sustancia utilizada como patrón interno debe ser similar al compuesto analizado, estar presente en concentraciones similares, tener un tiempo de retención cercano al del compuesto problema, pero sin interferir con él, ser inerte y no formar parte de la muestra.

d) *Estándar Agregado*. Consiste en inyectar dos muestras para realizar un análisis, una de ellas es la muestra tal cual y la otra es la muestra a la que se le agrega una cantidad conocida de estándar de referencia. Esta segunda muestra se utiliza como estándar. La concentración del analito en la muestra se calcula de la siguiente manera:

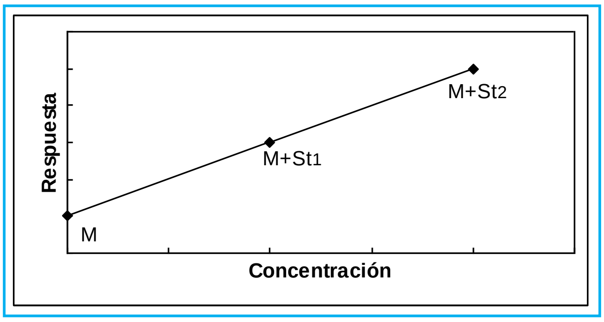
$$P = \frac{A_m \cdot C_s}{A_{ms} - A_m} \times D \times 100$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, A_m y A_{ms} son las áreas del analito en la muestra tal cual y la muestra a la que se le ha

agregado el estándar respectivamente, C_S es la concentración de estándar y D es un factor de dilución.

Este método, como el del Estándar Externo, tiene principalmente dos desventajas: requiere el uso de un estándar de referencia y es sensible a los errores de inyección y preparación de la muestra. A pesar de que es mucho menos utilizado resulta el método de elección cuando la matriz de la muestra es muy compleja y lleva a cambios o deformaciones en los picos. En estos casos suele también agregarse la matriz de la muestra al estándar como alternativa al método del Estándar Agregado.

Con este método se puede, al igual que con los anteriores, efectuar directamente los cálculos o trabajar con una curva de calibración. La diferencia respecto de los otros métodos es que en este caso la curva de calibración no es proporcional, es decir no pasa por el origen, y la ordenada al origen corresponde a la concentración de analito en la muestra, como se puede ver en la siguiente figura:



Agradecimiento: A la Lic. Analía Nolasco por el diseño de las figuras y gráficos incluidos en el presente capítulo.

Preguntas Orientadoras

1. Defina los siguientes parámetros y explique conceptualmente qué interpretan cada uno de ellos y para qué se utilizan:
   * Tiempo de retención

* Número de platos teóricos
* Factor de capacidad
* Factor de separación
* Resolución
* Tailing

2. Con qué varía el Tiempo de Retención?

3. En un sistema cromatográfico en fase reversa cómo puede modificar el factor de capacidad y el factor de separación?

4. Cuáles son las causas de la aparición del tailing? Cómo puede disminuirlo?

Test de Autoevaluación

1. En la cuantificación de un principio activo por HPLC, con cuál de estos métodos se independiza de los errores originados por variaciones en el volumen de inyección de la muestra?
   (a) Método del Estándar Interno
   (b) Método del Estándar Externo
   (c) Método del Estándar Agregado

2. La derivatización de un principio activo previo a la inyección en el cromatógrafo puede realizarse cuando:
   (a) El principio activo es polar
   (b) El principio activo está en gran cantidad
   (c) El principio activo no absorbe al UV

3. La velocidad lineal (μ) no depende de:
   (a) El tamaño de partícula de la Fase estacionaria

(b) La sección interna de la columna
(c) La porosidad del relleno de la columna

4. En Cromatografía en Fase Reversa, con cuál de estas Fases Móviles tendrá un mayor valor de k’ (Factor de Capacidad), para un determinado principio activo:
   (a) Metanol: Agua (60:40)
   (b) Metanol: Buffer Fosfato (70:30)
   (c) Acetonitrilo: Buffer Acetato (40:60)

5. Cuál de estos factores es importante para un buen rendimiento del sistema de bombeo en HPLC?
   (a) Fase móvil correctamente desgasificada
   (b) Temperatura de trabajo
   (c) Sistema de inyección automático

6. Cuál detector de los siguientes es más sensible?
   (a) Detector de Indice de Refracción
   (b) Detector UV
   (c) Detector Electroquímico

7. Cuál de estas Fases Estacionarias se usan en Cromatografía de Adsorción:
   (a) Copolímero de estireno-divinilbenceno
   (b) Dextrano
   (c) Alúmina

8. Cuál de estos factores extra-columnares influye en el ensanchamiento de los picos:
   (a) Volumen de inyección
   (b) Material de las tuberías
   (c) Longitud de onda de detección

9. En HPLC, cuál de los siguientes parámetros interpreta la Eficiencia de la columna cromatográfica:
   (a) Tiempo de retención
   (b) Número de platos teóricos
   (c) Factor de capacidad

Bibliografía

1. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J. (1979) *Introduction to modern liquid chromatography.* Wiley Int. Publication
2. Asshauer J.; Ullner H. (1986) *Practice of High Performance Liquid Chromatography*. Springer-Verlag
3. Quattrocchi, O.; Abelaira de Andrizzi, S. I.; Laba, R.F. (1992) *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica.* Buenos Aires: Artes Gráficas Farro
4. Novotny, M.; Wainer, I. (1985) *Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development: An Introduction*. Aster Pub.Co. Springfield
5. Engelhardt, H. (1986) *Practice of HPLC, Applications, Equipment and Quantitative Analysis.* Springer-Verlag, Heidelberg
6. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 34) (2011) Rockville.
7. Skoog, D. A.; Leary, J.J. (1996) *Analisis instrumental.* Mc Graw-Hill, 4ª. Ed.
8. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VII ed. (2003) Buenos Aires.

CAPITULO 5

ELECTROFORESIS CAPILAR

Pablo Quiroga

Introducción

La Electroforesis Capilar (EC), constituye una técnica de separación efectiva para un amplio espectro de analitos, desde pequeños iones inorgánicos hasta macromoléculas, permitiendo la separación tanto de moléculas cargadas como no cargadas. La misma provee datos confiables, requiere una preparación mínima de las muestras, ofrece un alto grado de automatización, presenta alta eficiencia en la separación, cortos tiempos de análisis, bajo volumen de inyección, permite la separación quiral sin la necesidad de columnas especiales, es de fácil operación y permite una variedad de sistemas de detección.

Principios básicos y fundamentos

La Electroforesis Capilar (EC) utiliza un campo eléctrico para separar los componentes de una mezcla, y se diferencia de otras formas de electroforesis en que la misma es llevada a cabo dentro de un capilar de diámetro estrecho. Fue desarrollada combinando propiedades o características de distintos métodos, los cuales incluyen, el principio de la electroforesis en gel, la Cromatografía Gaseosa en capilar de sílice fundido (GC) y la Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) con detectores altamente sensibles. Es altamente reconocido que las moléculas pueden estar cargadas eléctricamente ya sea de modo positivo o negativo; cuando el número de cargas positivas y

negativas es el mismo, las cargas se cancelan dando origen a una molécula neutra (sin carga). Si tenemos una mezcla constituida por sustancias iónicas disueltas en un solvente o medio adecuado (por ejemplo: agua), en ausencia de un campo eléctrico, el movimiento de los iones es esencialmente al azar ,pero, cuando un campo eléctrico es aplicado, las especies cargadas inician su movimiento y el mismo da como resultado una distribución de las partículas cargadas menos al azar, los cationes (iones cargados positivamente) se mueven hacia el cátodo (electrodo de carga negativa) y los aniones (iones cargados negativamente) se mueven hacia el ánodo (electrodo cargado positivamente) (ver figura 1).

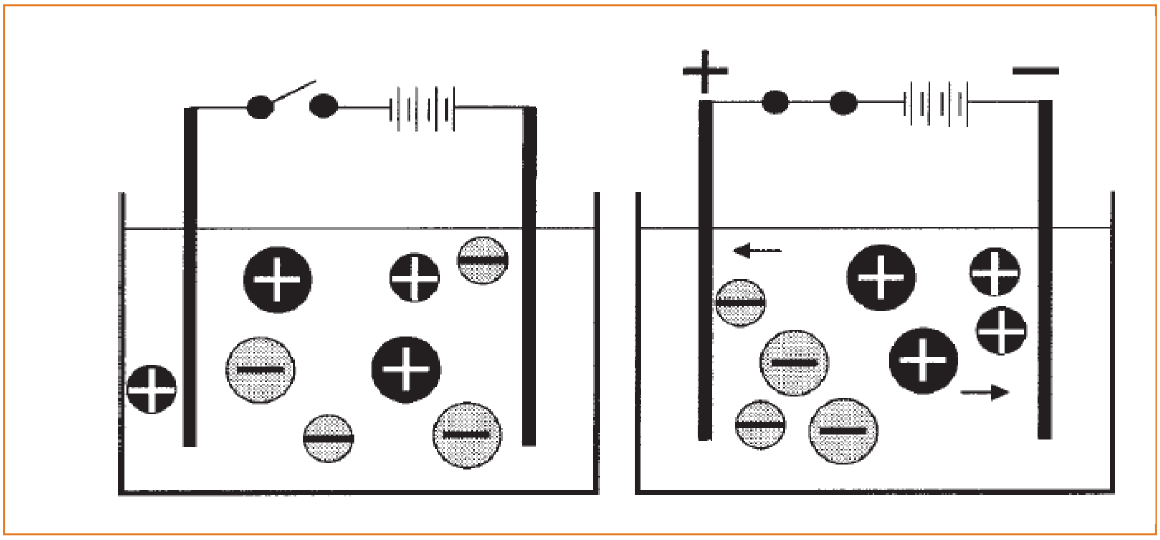


Figura 1. *Principio básico de la electroforesis*

La electroforesis en solución, se basa en la relación (carga / masa). En la Figura 1, podemos observar cuatro tipos de especies cargadas: partículas pequeñas y grandes cargadas positivamente y partículas pequeñas y grandes, cargadas negativamente, si cada partícula tiene una sola carga, el valor absoluto de la Fuerza (F) en cada una de ellas puede ser la misma y la aceleración creada por esta fuerza está dada por la siguiente ecuación:

F = masa x aceleración

El principio básico de la EC se basa en la migración diferencial de iones o solutos bajo la influencia de un campo eléctrico, en la misma, el fenómeno de

electroforesis es llevado a cabo dentro de un capilar de diámetro estrecho, relleno con electrolitos. Una de las ventajas de que la electroforesis se realice en capilares de diámetro estrecho (20 µm a 100 µm) es que los mismos evitan la generación de gradientes de temperatura, los cuales generan ensanchamiento de los picos y pérdida de resolución. La movilidad de los analitos depende de su tamaño, carga, el grado de ionización, la viscosidad del medio, temperatura, voltaje y constante dieléctrica del electrolito soporte.

La separación por electroforesis como dijimos anteriormente, se basa en las diferentes velocidades de los solutos bajo la influencia de un campo eléctrico, la velocidad de un ion puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$v_{ef} = \mu_{ef} \times E \quad (Ec.\ 1)$$

Dónde: v_{ef}: velocidad del ion; μ_{ef}: movilidad electroforética y E: campo eléctrico aplicado. El campo eléctrico *(E),* es una función del voltaje aplicado *(V)* y la longitud total del capilar *(L)* (Volts/cm).

La movilidad, para un determinado ion y en un determinado medio, es una constante, la cual es característica de dicho ion, la misma es el resultado de dos factores: por un lado el ion es atraído hacia el electrodo de carga opuesta moviéndose través del medio y al mismo tiempo, fuerzas de fricción dificultan su movimiento. El balance de estas dos fuerzas determina su movilidad final:

$$\mu_{ef} \propto \frac{\text{Fuerza Eléctrica } (F_E)}{\text{Fuerza de Fricción } (F_F)} \quad (Ec.\ 2)$$

La Fuerza del campo eléctrico y la Fuerza de Fricción, pueden representarse por las siguientes ecuaciones:

$$F_E = q \times E \quad (Ec.\ 3)$$

$$F_F = -6\pi\, \eta\, r\, v \quad (Ec.\ 4)$$

Dónde: q: carga del ión; η: viscosidad de la solución; r: radio del ión; v: velocidad del ión.

Durante el estado estacionario en la electroforesis, definido por el balance de estas fuerzas, las mismas son iguales pero opuestas, igualando las ecuaciones 3 y 4 obtenemos:

$$q \times E = -6\pi\, \eta\, r\, v \quad (Ec.\ 5)$$

Si reemplazamos la velocidad en la ecuación 5, por la ecuación 1, resulta:

$$q \times E = -6\pi\,\eta\, r\, \mu_{ef} \times E \text{ (Ec. 6)}$$

$q = -6\pi\ \eta\ r\ \mu_{ef}$ – Despejando el término correspondiente a $\mu_{ef,}$ obtenemos la siguiente relación:

$$\mu_{ef} = q / 6\pi\,\eta\, r \text{ (Ec. 7)}$$

Por lo tanto un ion de pequeño tamaño, sufrirá menores fuerzas de fricción y por lo tanto se moverá en el medio con mayor velocidad que uno de mayor tamaño, similarmente un ion con cargas múltiples, experimentará una mayor atracción hacia el electrodo moviéndose en el medio también más rápidamente. Está diferencia de velocidades es el fundamento del efecto de separación en la electroforesis.

Flujo Electroosmótico

Cuando se aplica un campo eléctrico a través del capilar relleno con solución amortiguadora, se genera un flujo de disolvente dentro del capilar que se denomina Flujo Electroosmótico *(EOF),* el mismo es un fenómeno que existe en un sistema electroforético, el mismo se genera, debido a que los capilares utilizados están constituidos por sílice fundida (cuarzo), por lo tanto la superficie interna del capilar está constituida por grupos silanoles (Si–OH), los cuales pueden presentar múltiples grados de ionización (pI = 3.0), por lo tanto, a todo pH > a 3.0 los grupos silanoles se ionizan o hidrolizan en un buffer electrolito acuoso, generando u originando como resultado una superficie interna del capilar negativa. Las cargas negativas de la pared interna del capilar, atraen los cationes de la solución del electrolito, los cuales están hidratados, creando una diferencia de potencial (potencial zeta) y generando una doble capa eléctrica. Cuando un voltaje es aplicado a través del capilar, los cationes que forman la doble capa difusa, son atraídos hacia el cátodo, y como los mismos están solvatados / hidratados, generan un movimiento de fluido hacia el cátodo, dando origen al *EOF*. La velocidad del *EOF*, depende de la movilidad electroosmótica *(μ_{eof})* que a su vez depende de la densidad de la carga en la pared interna del capilar y de las características de la solución amortiguadora.

La velocidad electroosmótica (v_{eof}) a través del capilar, está definida por la ecuación de Smoluchowski:

$$v_{eof} = -(\varepsilon\zeta/4\pi\eta)\ E \quad (Ec.8)$$

Dónde ε es la constante dieléctrica del electrolito, ζ es el potencial zeta (Volts), η es la viscosidad (Poise) y E es el potencial aplicado (Volts/cm). Controlando la magnitud del *EOF*, se puede influenciar de manera significativa la eficiencia y selectividad de la separación, debido a que el *EOF* es la principal fuerza que dirige la EC produciendo la migración de los analitos a través del mismo. Los factores que afectan el *EOF* incluyen, el campo eléctrico, pH, la concentración iónica del buffer electrolito soporte o solución amortiguadora, la adición de aditivos, temperatura y recubrimiento capilar.

Una característica importante del *EOF*, es el perfil de flujo plano, lo que indica que las fuerzas impulsoras del flujo están uniformemente distribuidas a lo largo del capilar. Este flujo plano es beneficioso para la separación, debido a que el mismo no contribuye a la dispersión de la zona de los solutos. Bajo condiciones normales (superficie del capilar cargada negativamente), el *EOF* tiene la dirección ánodo-cátodo, por lo tanto La movilidad electroforética del analito y la movilidad del *EOF*, pueden actuar en la misma dirección o en direcciones opuestas, dependiendo de la carga del soluto. En la electroforesis capilar normal, los aniones migrarán en la dirección opuesta al flujo electroosmótico y sus velocidades serán menores que la velocidad electroosmótica. Los cationes migrarán en la misma dirección del flujo electroosmótico y sus velocidades serán mayores que la velocidad electroosmótica. Bajo condiciones en las cuales hay una velocidad electroosmótica rápida con respecto a la velocidad electroforética de los solutos, tanto los cationes como los aniones se pueden separar en la misma corrida. Las movilidades eletroforéticas y electroosmótica del analito pueden tener el mismo sentido o sentido opuesto, según la carga (positiva o negativa) del soluto, resultando la velocidad del soluto (v) la siguiente:

$$v = v_{ef} \pm v_{eof} \quad (Ec.9)$$

Se utiliza la suma o la diferencia entre las dos velocidades (v_{ef} y v_{eof}) dependiendo de si las movilidades tienen el mismo sentido o sentido opuesto,

por lo tanto lo que medimos en presencia del *EOF*, es la llamada movilidad o velocidad aparente y no intrínseca de cada analito.

El tiempo que tarda en migrar la distancia (l) desde el extremo de inyección del capilar al punto de detección (longitud efectiva del capilar) es el siguiente:

$$t = l / (v_{ef} + v_{eof}) \quad (Ec.\ 10)$$

Descripción y tipo de instrumental

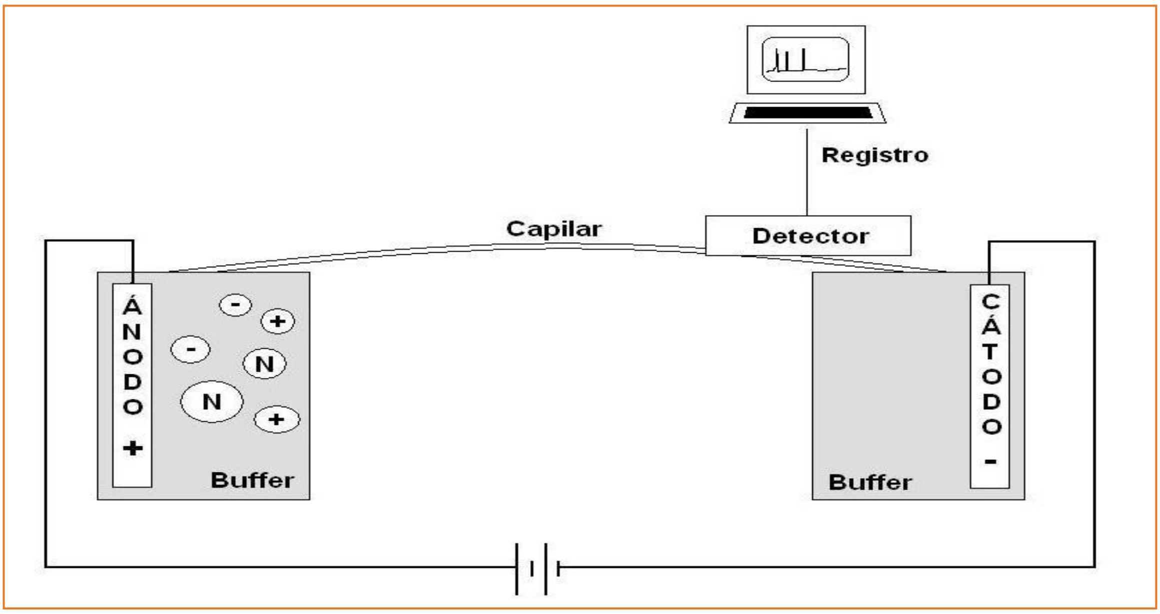


Figura. 2. *Esquema equipo básico de electroforesis capilar*

Un equipo de Electroforesis capilar (ver Figura 2), está compuesto basicamente por una fuente de alimentación de alto voltaje controlable, dos reservorios para las soluciones amortiguadoras, que se mantienen en el mismo nivel y que contienen las soluciones anódicas y catódicas, dos electrodos (ánodo y cátodo) sumergidos en los reservorios de las soluciones amortiguadoras y conectados a la fuente de alimentación, un capilar, generalmente de sílice fundida (cuarzo), donde se lleva a cabo la separación, cuyos extremos se encuentran ubicados en los recipientes de las soluciones amortiguadoras. El material del capilar debe ser química y eléctricamente inerte, transparente al UV-Visible, flexible y robusto; la sílice fundida (cuarzo), reúne la mayoría de estos requerimientos, y es por esta razón que el mismo es primariamente el material

empleado hoy en día. Para facilitar el manejo del capilar, el mismo esta recubierto por una capa protectora de poliimida, la cual le confiere alta flexibilidad, la desventaja que presenta este recubrimiento, es que el mismo es opaco a la luz UV, por lo tanto el mismo debe ser removido con el objetivo de generar una ventana o celda de detección sobre el capilar, esta ventana de visualización óptica, está alineada con el detector y permite la denominada detección “en línea”, es decir los analitos son detectados ha medida que migran por el capilar. Un aspecto crítico del capilar lo representa el espesor de la pared del mismo, debido a la generación de calor, el cual es producido cuando una corriente eléctrica pasa a través de un electrolito, este calor debe ser removido para evitar la generación de gradientes de temperatura y esto se logra reduciendo el espesor de la pared del capilar (25-75 μm), permitiendo de esta manera una disipación uniforme del mismo.

Otro componente fundamental de un equipo de EC, es el sistema de introducción cuantitativa (debido a que el volumen de muestra no es medido si no calculado mediante ecuaciones) de la muestra al capilar, la misma puede ser realizada por numerosos métodos, los dos más comúnmente utilizados son: inyección electrocinética o hidrodinámica. La inyección hidrodinámica (ver figura 3), se basa en las diferencias de presión entre el inicio y el final del capilar, la cual puede ser llevada a cabo mediante la aplicación de presión en el vial de entrada de la muestra, aplicación de vacío en el extremo final del capilar o por elevación del vial de ingreso de la muestra respecto del reservorio de salida de la muestra (efecto sifón). Con este tipo de inyección, la cantidad de muestra cargada dentro del capilar, es independiente de la matriz de la muestra. En la inyección electrocinética, el reservorio inicial es reemplazado por el vial conteniendo la muestra, un bajo voltaje (ej. 5-10 KV) es aplicado durante la inyección, este voltaje de inyección es generalmente 3 a 5 veces menor que el utilizado para llevar a cabo la separación de los componentes de la muestra. Durante este tipo de inyección los analitos ingresan al capilar tanto por migración como por acción de bombeo del *EOF*. Una propiedad única de este tipo de inyección es que la cantidad ingresada o cargada en el capilar es dependiente de las movilidades electroforéticas de los solutos individuales,

introduciendo un posible sesgo en los resultados. La inyección electrocinética es muy simple y ventajosa cuando son empleados medios viscosos o geles en el capilar y cuando la inyección hidrodinámica no es efectiva.

Sistemas de detección: la separación en EC, puede ser detectada por diversos sistemas de detección, los cuales incluyen, UV, UV-Visible, fluorescencia inducida por láser, espectrometría de masas, fluorescencia, quimioluminiscencia, amperometría, NMR, etc. La detección UV indirecta es ampliamente utilizada para la detección de solutos que no contienen grupos cromóforos en su estructura, tales como, iones metálicos, o aniones inorgánicos. En el caso de la detección UV indirecta, es necesario la adición de una sustancia cromofora a la solución amortiguadora.

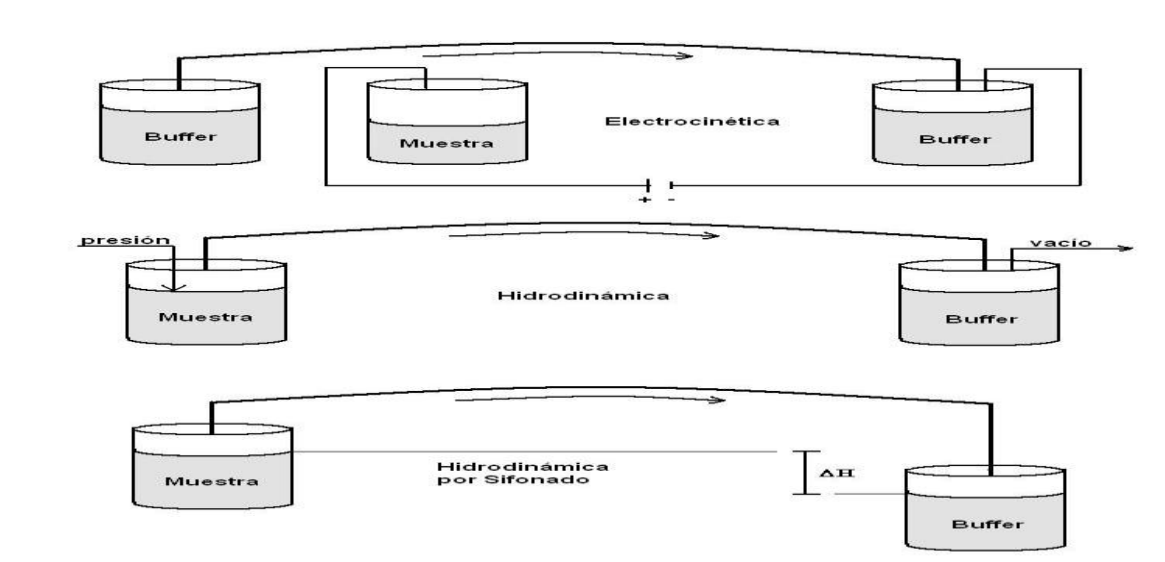


Figura. 3. *Diagrama de los métodos de introducción de la muestra al capilar*

Modos de separación en electroforesis capilar

El proceso de electroforesis capilar, es actualmente un término genérico y dependiendo del tipo de capilar y el electrólito utilizado, la tecnología de EC *puede ser dividida en diferentes técnicas o modos de separación:*

Electroforesis Capilar en Solución Libre (ECSL), Electroforesis Capilar en Gel, Cromatografía Electrocinética Capilar, Cromatografía Electrocinética Micelar

(CECM), Isoelectroenfoque Capilar, Electroforesis Capilar Quiral (ECQ), entre otras. A continuación, se describen los modos de separación de mayor aplicación en el análisis farmacéutico de pequeñas moléculas:

Electroforesis Capilar en Solución Libre (ECSL): en esta técnica de EC, los analitos se separan en un capilar que contiene únicamente una solución amortiguadora sin ningún medio anticonvectivo. La separación ocurre debido a que los distintos componentes de la muestra migran como bandas discretas con velocidades diferentes. La velocidad de cada banda depende de la movilidad electroforética (relación carga/masa) del soluto y del flujo electroosmótico en el capilar. Es el modo más comúnmente utilizado en EC. El orden de migración en esta técnica, será el siguiente: los cationes con grandes relaciones carga/masa, migrarán primero, seguido por los cationes con relación carga/masa menor, los solutos neutros, aniones con menor relación carga/masa, y finalmente los aniones con mayor relación carga/masa.

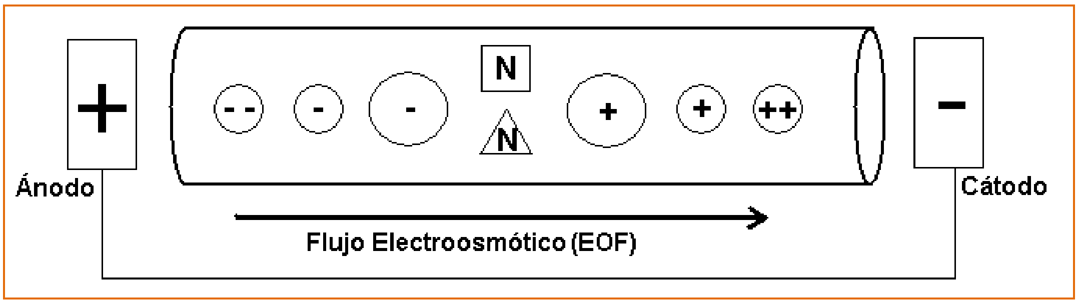


Figura. 4. *Orden de migración en electroforesis capilar en solución libre*

Está técnica permite separar tanto aniones como cationes en la misma corrida bajo condiciones de alto *EOF*. Esté método de EC es apropiado para el análisis de moléculas pequeñas (PM <2000) y grandes (2000 < PM < 10000). Debido a la alta eficiencia lograda, se pueden separar moléculas que presenten diferencias pequeñas en su relación carga/masa. Esté método también permite la separación de compuestos quirales al agregar selectores quirales a la solución amortiguadora de separación.

Para lograr una óptima separación, hay que tener en cuenta diferentes parámetros que se describen a continuación:

Voltaje: el tiempo de separación es inversamente proporcional al voltaje aplicado, sin embargo, un aumento en el voltaje aplicado, puede producir la generación de un calor excesivo, aumentando de esta manera los gradientes de temperatura y viscosidad en la solución amortiguadora dentro del capilar, cuya consecuencia es el ensanchamiento del pico o banda de cada soluto con la consecuente disminución de la resolución.

Temperatura: el principal efecto de la misma es sobre la viscosidad y la conductividad eléctrica de la solución amortiguadora, afectando la velocidad de migración.

Capilar: el largo y diámetro interno del capilar afectan el tiempo de análisis y la eficiencia de las separaciones. El aumento tanto del largo efectivo, como del largo total, permiten disminuir los campos eléctricos a un voltaje constante, lo cual aumenta el tiempo de migración. Para una solución amortiguadora y un campo eléctrico determinado, la disipación del calor (ensanchamiento del pico o banda de cada soluto) depende del diámetro interno del capilar, como hemos descripto anteriormente. Es importante destacar que el diámetro del capilar puede afectar el límite de detección, dependiendo del volumen de muestra inyectado en el mismo y el sistema de detección utilizado.

Cromatografía Electrocinética Micelar (CECM):

En esta técnica, la separación ocurre en una solución electrolítica que contiene un agente tensioactivo, generalmente iónico (el más comúnmente utilizado es el Dodecilsulfato de sodio), en una concentración por encima de la concentración micelar crítica. El principio de la separación, está basado en la partición diferencial de las moléculas de soluto entre la solución amortiguadora acuosa y la pseudo fase estacionaria compuesta por las micelas según el coeficiente de partición del soluto. Está técnica puede ser considerada un híbrido entre la electroforesis y la cromatografía. Presenta gran utilidad para la separación de mezclas que contienen, tanto especies iónicas como neutras y compuesto farmacéuticos muy hidrofóbicas y sus correspondientes metabolitos polares. En la CECM, las moléculas hidrofóbicas permanecerán la mayoría del tiempo en la micela, mientras que las moléculas hidrofílicas migrarán rápidamente a través del solvente.

A pH neutro y alcalino, se genera un flujo electroosmótico fuerte que arrastra los iones de la solución amortiguadora de separación hacia el cátodo. Si se utiliza dodecilsulfato de sodio como tensioactivo, la migración electroforética de la micela aniónica se produce en sentido opuesto. Como resultado, la velocidad general de migración de las micelas disminuye en comparación con el *EOF*. En el caso de solutos neutros, como el mismo puede repartirse entre la micela y la solución amortiguadora acuosa y no tiene movilidad electroforética, la velocidad de migración del analito dependerá únicamente del coeficiente de partición entre la micela y la solución amortiguadora. En el electroferograma, el pico correspondiente a cada soluto sin carga, siempre se encuentra entre el del marcador del flujo electroosmótico y el de la micela; y el tiempo transcurrido entre estos dos picos se denomina *ventana de separación*. Para los solutos con carga eléctrica, la velocidad de migración depende del coeficiente de partición del soluto entre la micela y la solución amortiguadora acuosa y de la movilidad electroforética del soluto en ausencia de micelas.

El mecanismo de separación es esencialmente cromatográfico y la migración del soluto y la resolución se pueden expresar en función del factor de capacidad del soluto ($K^{¨}$), que es la relación entre el número total de moles de soluto en la micela y los moles en la fase móvil. Si consideramos un compuesto neutro, $K^{¨}$ está dado por la siguiente ecuación:

$$K^{¨} = (t_r – t_0) / t_0 (1- t_r / t_{m)} = K [V_S / V_M] \quad (Ec.11)$$

t_r , es el tiempo de migración del soluto; T_0 es el tiempo de análisis del soluto no retenido obtenido al inyectar un marcador de flujo electrosmótico que no ingresa ni interactúa con la micela (ej. Metanol); t_m es el tiempo de migración de la micela medido al inyectar un marcador de micela, (Ej. Sudam III) el cual migra asociado de manera continua con la micela; *K* es el coeficiente de partición del soluto; V_S es el volumen de la fase de las micelas; y V_M es el volumen de la fase móvil.

Para lograr una óptima separación hay que tener en cuenta diferentes parámetros que se describen a continuación:

Voltaje: el tiempo de separación es inversamente proporcional al voltaje aplicado, sin embargo, un aumento en el voltaje aplicado, puede producir la

generación de un calor excesivo, aumentando de esta manera los gradientes de temperatura y viscosidad en la solución amortiguadora en la sección transversal del capilar, este efecto puede ser significativo con amortiguadores de pH de alta conductividad, como por ejemplo aquellos que contienen micelas. La disipación insuficiente del calor ensancha el pico o banda y disminuye la resolución.

Temperatura: las variaciones en la temperatura del capilar afectan el coeficiente de partición del soluto entre la solución amortiguadora y la micela, la concentración micelar crítica, y la viscosidad de la solución amortiguadora, todos estos parámetros afectan el tiempo de migración de los solutos.

Capilar: el largo y el diámetro interno contribuyen al tiempo de análisis y a la eficiencia de las separaciones. El aumento del largo efectivo y del largo total puede disminuir los campos eléctricos, trabajando a un voltaje constante, aumenta el tiempo de migración y mejora la eficiencia de la separación.

Tipo de agente tensioactivo y concentración: el tipo de agente tensioactivo, al igual que la fase estacionaria en cromatografía, afecta la resolución ya que modifica la selectividad de la separación. El logaritmo de $K^{¨}$ de un compuesto neutro aumenta linealmente con la concentración de detergente en la fase móvil. Cuando $K^{¨}$ se acerca al valor de $(t_m / t_0)^{1/2}$ la resolución de la *CECM* alcanza su máximo. La modificación de la concentración del agente tensioactivo cambia la resolución.

pH: si bien el pH no modifica el coeficiente de partición de solutos no ionizados, puede modificar el *EOF* en capilares sin recubrimiento. Si se disminuye el pH de la solución amortiguadora, disminuye el *EOF*, aumenta la resolución de los solutos neutros y aumenta el tiempo de análisis.

Disolventes orgánicos: la adición de solventes orgánicos a la solución amortiguadora (ej. Metanol, acetonitrilo, propanol, etc) disminuye el tiempo de migración, también afecta la formación de las micelas por lo cual estos modificadores orgánicos pueden utilizarse hasta una concentración determinada para un agente tensioactivo específico, de manera de evitar la eliminación o alteración del equilibrio de micelación. Si desaparecen las micelas, desaparece el mecanismo de partición de la *CECM*.

Electroforesis Capilar Quiral: la separación quiral, constituye una herramienta muy importante para la separación de drogas quirales, porque numerosas moléculas farmacéuticas son quirales y cada enantiómero expresa una actividad farmacológica y toxicológica diferente, por ejemplo: AINES, y drogas antihipertensivas. La separación quiral es necesaria en el análisis farmacéutico para la obtención del enantiómero seguro y efectivo. La *ECQ*, puede ser llevada a cabo por métodos directos o indirectos. En los métodos indirectos, la mezcla racémica interacciona con un reactivo quiral originando diastereoisomeros con propiedades físicas y químicas diferentes, permitiendo separa ambos diastereoisomeros. En los métodos directos, los selectores quirales son adicionados a la solución amortiguadora para interaccionar de manera estereoselectiva con cada enantiómero. El método directo, es más favorable que el método indirecto, debido a que es más simple y se cuenta con una amplia disponibilidad de selectores quirales. Las ciclodextrinas son los selectores quirales más utilizados en la separación quiral de drogas y forman complejos de inclusión con los enantiómeros. La separación quiral puede ser realizada mediante la aplicación de la *CECM*, en la cual se adicionan selectores quirales en el sistema micelar unido al agente tensioactivo por enlace covalente o agregando directamente al electrolito de separación micelar Las micelas que tienen un grupo con propiedades de discriminación quiral incluyen sales, N-dodecanoil-L-aminoacidos, sales biliares, etc.

Análisis cuantitativo en electroforesis capilar

Las áreas de los picos se dividen por el tiempo de migración correspondiente con el objetivo de obtener el área corregida a fin de compensar el cambio en el tiempo de migración de corrida a corrida, reduciendo la variabilidad de la respuesta. Dividiendo las áreas de los picos por el tiempo de migración, se compensan las distintas respuestas de los constituyentes de la muestra que tienen diferentes tiempos de migración. Cuando se utiliza un estándar interno,

hay que verificar que no enmascare ninguno de los picos de la muestra a analizar.

Aplicaciones de la Electroforesis Capilar al análisis farmacéutico

La EC es una poderosa herramienta analítica, la cual ha incrementado su utilidad en el análisis farmacéutico en los últimos tiempos. Es utilizada como una técnica alternativa al HPLC, debido a su alta eficiencia, velocidad de análisis, reducción en el consumo de solventes y muestra, y bajo costo de operación comparada con la metodología por HPLC. Es utilizada en el control de calidad de rutina, en la valoración de ingredientes farmacéuticos activos en las distintas formas farmacéuticas, evaluación de impurezas en productos farmacéuticos, separación y cuantificación de moléculas quirales, cuantificación de principios activos y/o metabolitos en fluidos biológicos, estudios de estabilidad y es altamente utilizada en la industria farmacéutica biotecnológica.

Preguntas Orientadoras

1. Describa el fundamento de la Electroforesis Capilar.
2. A que se denomina ventana de separación y como procedería para evaluar la misma?
3. Que técnica de electroforesis capilar utilizaría para la separación de compuestos neutros? Justifique.
4. Describa el Flujo electroosmótico.
5. Que parámetro utiliza en la cuantificación de un analito en EC y que precauciones debe seguir con el mismo.? Justifique

Test de Autoevaluación

1. El calor generado durante una separación por EC
   - (a) Aumenta la resolución.
   - (b) Disminuye el ancho de las bandas o picos
   - (c) Aumenta el ancho de las bandas o picos y disminuye la resolución
   - (d) Aumenta la eficiencia

2. La separación y cuantificación de compuestos quirales puede llevarse a cabo utilizando:
   - (a) Electroforesis capilar en Solución Libre
   - (b) Cromatografía Electrocinética Micelar
   - (c) Cromatografía Electrocinética Micelar con selectores quirales
   - (d) Electroforesis capilar en Solución Libre con la adición de selectores quirales

3. La modificación de la Temperatura en la EC:
   - (a) Afecta la conductividad eléctrica
   - (b) Afecta la viscosidad de la solución amortiguadora
   - (c) Afecta el tiempo de migración
   - (d) Todas son correctas

4. El Flujo Electroosmótico es mayor a:
   - (a) pH ácidos
   - (b) pH neutro
   - (c) pH alcalino

Bibliografía

1. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 34) (2011) Rockville

2. Farmacopea Europea (Ph. Eur. 7.0) (2011).

3. Bhupinder, S, S. (2011). *An Overview of Capillary Electrophoresis: Pharmaceutical, Biopharmaceutical and Biotechnology Applications*. J. Pharm. Educ. Res. Vol.2. pp 2-21

4. Suntornsuk, L. (2007). *Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis: A Survey on Recent Applications*. Journal of Chromatographic Science. Vol. 45. pp 559.

5. Petersen, J.R. and Mohammad A. A. (2001). *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. Humana Press.Inc, Totowa, NJ

6. Heiger,D. (1992). *High Performance Capillary Electrophoresis- An Introduction*. Hewlett – Packard Company. "2nd Edition.

CAPITULO 6

MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS APLICADOS AL ANÁLISIS FARMACÉUTICO

María Guillermina Volonté

Introducción

Todos los átomos y moléculas son capaces de absorber energía, de acuerdo con ciertas limitaciones, las cuales dependen de la estructura de la sustancia. La energía se puede proporcionar en forma de radiación electromagnética (luz). El tipo y cantidad de radiación absorbida por una molécula guarda relación con la estructura de la molécula; la cantidad de radiación absorbida depende del número de moléculas que interaccionan con la radiación. El estudio de estas dependencias se conoce como Espectroscopia de absorción.
La espectroscopia de absorción es, indudablemente una de las técnicas analíticas más útiles; sus ventajas incluyen rapidez, sencillez, especificidad y sensibilidad.

Espectroscopía ultravioleta y visible

Consiste en la medida de la absorción de las radiaciones electromagnéticas comprendidas en un intervalo espectral de 200 a 400 nm para la región ultravioleta y de 400 a 700 nm para la región visible.
El grado en que la radiación es absorbida se expresa en términos de absorbancia, *A*, que es el logaritmo decimal de la inversa de la transmitancia, *T*, siendo esta última definida como la fracción de radiación incidente que logra atravesar la muestra.

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$

Donde I_0 es la intensidad de radiación incidente e I es la intensidad de radiación transmitida.

De acuerdo con la ley de Lambert Beer, la absorbancia es proporcional al paso óptico, *b,* de la capa absorbente atravesada por la radiación y a la concentración, *c*, del analito:

$$A = kbc \qquad (1)$$

La constante de proporcionalidad, *k,* es independiente de la concentración, paso de luz e intensidad de la radiación. Depende de la temperatura, disolvente, estructura molecular y longitud de onda (λ) de la radiación. Asume distintas denominaciones según las unidades en que *b* y *c* se expresan:

⟶ **Absortividad** (a)*:* es la absorbancia de una solución cuya concentración es de 1 g por litro, medida en una celda de paso óptico *b*, de 1 cm.

$$a = \frac{A}{cb}$$

⟶ **Absortividad específica** ($A_{1cm}^{1\%}$): es la absorbancia de una solución cuya concentración es de 1%, medida en una celda de paso óptico *b,* de 1 cm.

$$A_{1cm}^{1\%} = \frac{A}{cb} = 10a$$

⟶ **Absortividad molar** ($\in$)*:* es la absorbancia de una solución cuya concentración es 1 mol por litro, medida en una celda de paso óptico *b,* de 1 cm. Puede calcularse como el producto de la absortividad por el peso molecular, *PM,* del analito:

$$\in = aPM$$

Los valores de *a,* $A_{1cm}^{1\%}$ y $\in$, a una longitud de onda específica y en un solvente determinado son característicos del analito.

Espectro de absorción

Se obtiene un espectro de absorción midiendo la absorbancia de una solución como función de la longitud de onda. Los espectros ultravioleta y visible (UV-VIS) se representan como trazados de la absorbancia (eje de ordenadas) respecto a la longitud de onda.

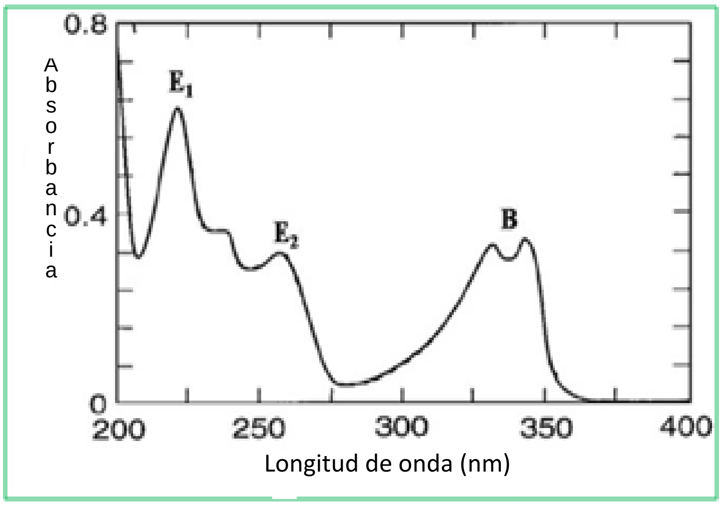


Figura 1. *Espectro típico de absorbancia de una sustancia determinada*

Análisis cuantitativo

Si de una serie de soluciones de la misma sustancia se mide la absorbancia de cada una de ellas a la misma longitud de onda, temperatura y condiciones de disolución, y se representa la absorbancia de cada solución en función de su concentración se obtendrá por lo general, una línea recta que pasa por el origen, de acuerdo con la ecuación (1). Esta gráfica se denomina trazado de la ley de Beer, o curva de calibración para el método de absorción UV-VIS, y si la línea es recta se dice que cumple con la ley de Beer en el margen de concentración investigado.

La pendiente de la línea es igual a [**k*b***] y dado que se conoce ***b*** se puede calcular la absortividad (k).

La longitud de onda seleccionada para la determinación de la absortividad es usualmente λ_{max}, por dos razones:

1) la sensibilidad máxima se alcanza trabajando en el máximo de la banda, puesto que una concentración dada produce la señal más fuerte a esta longitud de onda;
2) la variación de la absorbancia para pequeños cambios de la longitud de onda es mínima en el máximo de la banda; por consiguiente, los inevitables pequeños errores en la fijación del selector de longitudes de onda del instrumento no serán causa de grandes errores en la medida de la absorbancia.

Análisis de un componente único

Para determinar la concentración de una muestra desconocida con un único componente, se debe obtener una curva de calibración usando soluciones de un estándar del principio activo. La longitud de onda seleccionada corresponde al máximo de absorción. Luego se mide la absorbancia de la muestra desconocida y su concentración puede obtenerse gráficamente, por intersección en la curva de calibración, o analíticamente, por interpolación en la ecuación de la recta.

En una versión simplificada de este método se emplea una medida concomitante "unipuntual" de la Absorbancia con la solución de la muestra y una solución preparada con un estándar de referencia o Sustancia de Referencia (SR), y se expresa la ley de Beer para cada solución:

$A_p = abC_p$ p = Sustancia de Referencia (SR)

$A_m = abC_m$ m = muestra

Dividiendo estas ecuaciones y resolviendo para C_m

$$Cm = \frac{AmxCp}{Ap}$$

La reproducibilidad dentro de una serie de medidas individuales es usualmente 0.5-2% Por ello, para reproducir la absortividad es necesario realizar las lecturas de referencias o patrones, y muestras al mismo tiempo y con el mismo equipo. En el caso de que se haya obtenido una curva de calibración, es conveniente realizar un control de la misma cada vez que se emplea.

Análisis de multicomponentes

En caso de tener una mezcla de dos sustancias en un disolvente transparente y que cada una de las mismas absorba luz, procedemos de la siguiente manera: si los espectros de absorción de los dos componentes son tan diferentes que se pueden encontrar dos longitudes de onda en las cuales cada sustancia absorbe luz sin interferencia de la otra, el problema se reduce al del análisis de un componente único, porque ningún componente interfiere en el análisis de los demás. En el caso más general, ambas sustancias absorben luz a las mismas longitudes de onda, pero si sus espectros de absorción son marcadamente distintos aún es posible analizar la mezcla.

Primero hay que determinar los espectros de absorción de los dos componentes puros (P y Q), los cuales se comparan convirtiendo los valores de absorbancia a un dato común, como absortividades molares y procediendo a superponer los espectros. Se seleccionan dos longitudes de onda analíticas, de tal forma que sea máxima la diferencia entre la absorción de los compuestos a estas longitudes de onda siendo la absortividad del compuesto P mayor que para el compuesto Q a una longitud de onda y menor en la otra. En general, es necesario seleccionar tantas longitudes de onda analíticas como componentes hay en la mezcla.

La próxima etapa en el análisis consiste en trazar las representaciones de la ley de Beer, utilizando soluciones de las sustancias puras para cada compuesto a cada longitud de onda. Así se obtienen cuatro gráficas de la ley de Beer, a partir de las cuales se calculan cuatro absortividades, simbolizadas

por a_1^p, a_2^p, a_1^q,a_2^q, donde el superíndices indica el compuesto y el subíndice, la longitud de onda.

Ahora se puede analizar cualquier solución que contenga los compuestos P y Q. Se mide la absorbancia de la solución a las longitudes de onda 1 y 2. Se considera que la absorbancia de una mezcla es igual a la suma de las absorbancias de los componentes de la mezcla. Por tanto, si A_1 y A_2 son las absorbancias de la mezcla a las longitudes de onda 1 y 2,

$$A_1 = A_1^P + A_1^q \qquad (2)$$

$$A_2 = A_2^p + A_2^q \qquad (3)$$

Se pueden reemplazar las absorbancias de los segundos miembros de las ecuaciones (2) y (3), por las correspondientes expresiones de la ley de Beer; así, $A_1^p = a_1^p bC_1 p$, etc.

$$A_1 = a_1^p bC_1^p + a_1^q bC_1^q \qquad (4)$$

$$A_2 = a_2^p bC_2^p + a_2^q bC_2^q \qquad (5)$$

Las ecuaciones (4) y (5), constituyen un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas, C^p y C^q, fácil de resolver. Cabe extender esta descripción del análisis de mezclas a aquellas que tengan más de dos componentes si los espectros de absorción son lo suficientemente distintos.

Desviaciones de la ley de Beer

- **De origen químico.** En algunos casos se observa que la representación de la ley de Beer no es una recta sino que presenta cierta curvatura. Los equilibrios de asociación y disociación son las causas usuales de estas desviaciones.

- **De naturaleza instrumental**. Las lámparas de deuterio o tungsteno, las cuales emiten radiación continua ultravioleta-visible, son empleadas como fuente de luz de espectrofotómetros. El monocromador selecciona un haz de radiación de longitud de onda dada por medio de un elemento dispersante (prisma o red de difracción) y una rendija. Sin embargo, la banda de radiación puede no ser verdaderamente monocromática, y la luz emitida puede contener luz de longitud de onda cercana a la seleccionada. Por tanto, se debe considerar que, sobre la muestra incide un intervalo espectral de anchura finita ($\Delta\lambda$).

  Diferentes $\Delta\lambda$ dan distintas absorbancias para una misma muestra, pues la absortividad depende de la longitud de onda y del $\Delta\lambda$. La absortividad observada difiere de la verdadera y son posibles desviaciones en el trazado de la ley de Beer.

  Se suele minimizar este efecto estableciendo la λ de lectura a la $\lambda_{máx}$, máximo de absorción, ya que a esta longitud de onda, la absortividad no cambia demasiado con la longitud de onda excepto que la banda de absorción sea extremadamente aguda.

- **Otra causa de desviaciones es la luz extraña**, que es radiación espúrea, procedente de fuentes incontroladas, tales como orificios del alojamiento del compartimento de la cubeta. Es radiación que incide sobre el detector sin pasar por la muestra. Para absorbancias bajas, una pequeña cantidad de luz externa inabsorbida producirá un error pequeño, pero a absorbancias muy altas se produce un error negativo mayor (la absorbancia leída será menor pues la transmitancia resultante es mayor ya que se suma a la luz transmitida por la muestra, la luz espúrea). Es decir, que este efecto origina una desviación negativa en el trazado de la ley de Beer.

Espectrofotómetros de absorción ultravioleta y visible

Los componentes básicos de un espectrofotómetro son: la fuente de luz, el selector de longitudes de onda, el compartimento de la muestra, el detector de radiación y el sistema de procesamiento y dispositivo de lectura de las señales.

En la región ultravioleta se emplean lámparas de deuterio (160-375 nm) y en el visible lámparas de filamento de tungsteno (350 – 2500nm), como fuentes de luz continua.

En referencia al selector de longitudes de onda, para la mayoría de los análisis espectroscópicos se necesita una radiación constituida por un grupo limitado y continuo de longitudes de onda estrechas denominado *banda*. Existen dos clases de selectores: los filtros y los monocromadores. Los primeros pueden ser filtros de absorción, que se limitan a la región visible, o de interferencia que operan en las regiones UV-VIS e infrarroja (IR). En cuanto a los monocromadores están diseñados para realizar barridos espectrales, utilizan rendijas, lentes, espejos, ventanas y prismas o redes de difracción, constituyen los elementos dispersantes que permiten seleccionar luz de una determinada longitud de onda, en realidad en bandas estrechas de longitudes de onda, como ya hemos mencionado.

Las celdas o cubetas que contienen la muestra deben ser transparentes a la radiación, por lo que se emplean cubetas de cuarzo o sílice fundida en el UV y de vidrio en el visible.

Para detectar la intensidad de luz transmitida por la muestra se emplean dispositivos electrónicos sensibilizadores o fototubos y tubos multiplicadores que convierten la energía radiante en una señal eléctrica. Pueden ser detectores fotoeléctricos, llamados también cuánticos o detectores caloríficos.

Por último la señal del detector es amplificada mediante un dispositivo electrónico con el cual se obtiene una lectura de transmitancia o de absorbancia. Los instrumentos modernos incorporan distintos tipos de dispositivos de lectura, algunos digitales, escalas potenciométricas, registradores y tubos de rayos catódicos.

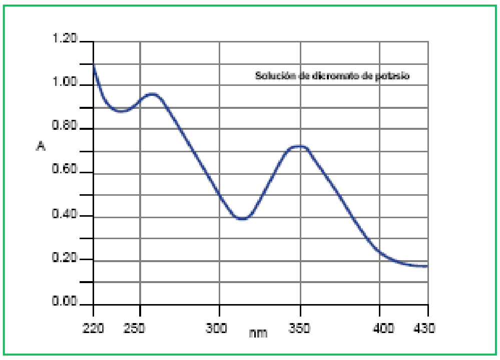
En general los espectrofotómetros pueden ser de simple o de doble haz. Los primeros utilizan un prisma o red de difracción y son de alta precisión, en ellos la muestra y la referencia deben ser interpuestas manualmente en el haz de luz. En cambio en los de doble haz la radiación del monocromador es dividida en dos, por un espejo rotatorio, mientras que un haz atraviesa la muestra el otro lo hace por la referencia y luego son recombinados en el foco del detector.

Calibración de los espectrofotómetros

El objetivo de calibrar un espectrofotómetro es asegurar que el mismo funciona totalmente bajo control y proporcionará, de forma consistente y repetitiva, lecturas correctas de absorbancia a determinadas longitudes de onda.

Los parámetros a estudiar son los siguientes:

A. Comprobación de las absorbancias (exactitud fotométrica)



1º) Preparar una solución de dicromato potásico (R) de la siguiente manera: secar el dicromato, calidad estándar, a 130ºC hasta peso constante. Pesar aproximadamente y exactamente, 60 mg; disolver y llevar a 1000 ml con ácido sulfúrico 0,005 M.

2º) Determinar la absorbancia de dicha solución en cubeta de 1cm de paso óptico, utilizando ácido sulfúrico 0,005 M como blanco, a 235; 257; 313 y 350 nm.

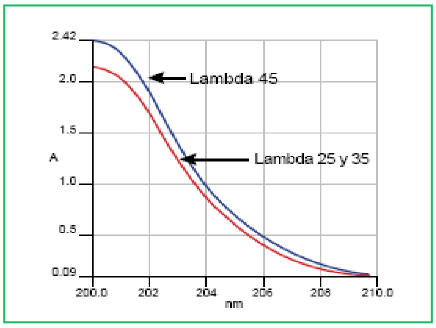
3º) Calcular para cada longitud de onda la absortividad específica, mediante la expresión:

$$A_{1cm}^{1\%} = \frac{A(\lambda) \times 10}{C}$$

4º) La tolerancia de $A_{1cm}^{1\%}$ a cada longitud de onda se indican en la siguiente tabla:

Longitud de onda λ (nm)	**Tolerancia**
235	122,9- 126,2
257	142,4 – 145,7
313	47,0 – 50,3
350	104,9- 108,2

B. Comprobación de la luz espúrea



1º) Preparar una solución de cloruro de potasio al 1,2% p/v en agua destilada.

2º) Determinar su absorbancia en cubeta de 1 cm, a 200 nm ± 2, utilizando agua destilada como blanco.

La absorbancia leída deberá ser mayor a 2.

B. Celdas

Se determina la absorbancia de un solvente (Etanol 96º), utilizando dos celdas distintas, a 285 nm. Las lecturas deben tener igual valor. De lo contrario debe aplicarse un factor de corrección al intercambiar las celdas.

Tolerancia ± 0,005 cm en el paso óptico.

C. Solventes

Cuando se mide la Absorbancia del solvente de trabajo a una λ determinada, la Absorbancia de la celda de referencia y su contenido no debe ser mayor a 0,4 y es preferible que sea menor a 0,2 cuando se mide con referencia al aire.

Absorbancia solvente de trabajo (λ) $<$ 0,4 (referencia aire)

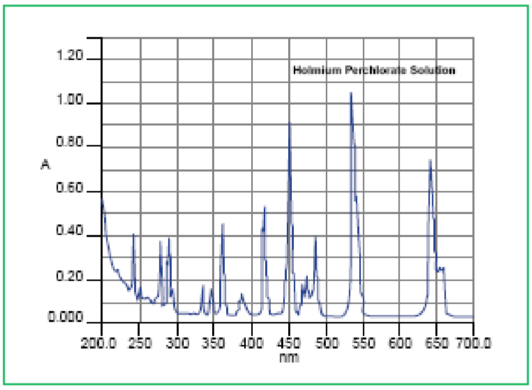
D. Deriva

Medir la absorbancia sin celda a lo largo del tiempo, durante 30 minutos en el rango de 200 a 700 nm. Elegir tres λ. Calcular la diferencia de absorbancia entre 0 y 30 minutos a cada λ y multiplicar por 2, para obtener la deriva.

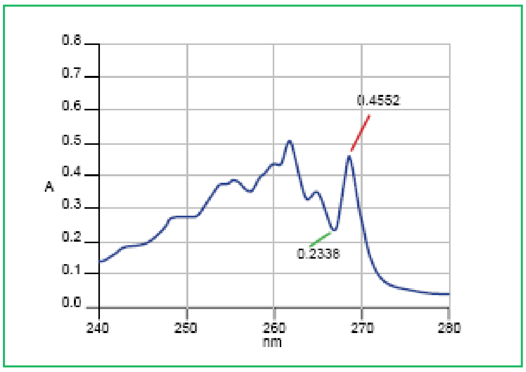
$$\text{Deriva}_{(\lambda)} = (A_{(\lambda)}30\text{ min} - A_{(\lambda)}0\text{ min}) \times 2$$

Especificación = 0,0003 A/ hora

Otros ensayos:



Verificación de la escala de longitud de onda: existen diversas formas de verificarla, una de ellas consiste en medir los máximos de absorbancia de una solución estándar de perclorato de holmio a 214,15; 287,15; 361,50 y 536,30 nm.



Prueba de resolución: se prepara una solución al 0.02% p/v de tolueno en hexano. La relación de picos a 269 nm y 266 nm debe ser mayor a 1.5.

Campos de aplicación

Las aplicaciones de los métodos cuantitativos de absorción ultravioleta/visible son numerosas y abarcan todos los campos en que se demanda información química cuantitativa.

En la mayor parte de los análisis espectrofotométricos cuantitativos se emplean medidas realizadas en las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético. El compuesto a ensayar debe tener absorción de suficiente intensidad para tener utilidad en análisis, y la muestra no debe contener sustancias interferentes.

Una de las ventajas de la espectroscopía de absorción es su especificidad, o ausencia de interferencias. Incluso en aquellos casos en que las bandas de absorción se interfieren parcialmente, es posible superar dicha interferencia ya sea provocando un desplazamiento del espectro de absorción del compuesto a cuantificar hacia una zona libre de bandas interferentes por medio de una variación de pH, o bien se puede recurrir a una técnica especial, por ejemplo la *espectroscopía derivativa*.

Otra forma de desplazar el espectro de absorción de un compuesto es por conversión en la región visible, convirtiéndose entonces una sustancia incolora en un derivado coloreado. Esta técnica se denomina: *análisis colorimétrico*. Existen técnicas generales de análisis colorimétrico para los distintos grupos funcionales.

Es muy importante para un análisis correcto, determinar con exactitud las condiciones en que se realiza el método; por ejemplo: solvente, pH, tiempo de

reacción, concentración de la solución de lectura, y cualquier variable que puede afectar o modificar la absorbancia de la sustancia analizada.

Espectroscopía Derivativa

La espectroscopía derivativa es una técnica analítica moderna de gran utilidad para extraer información cualitativa y cuantitativa a partir de espectros compuestos por bandas sin resolver, utilizando la primera derivada o derivadas de órdenes superiores, de la absorbancia con respecto a la longitud de onda. La técnica enfatiza características sutiles del espectro, presentándolas de una forma distinta y visualmente accesible, permitiendo la resolución de muestras multicomponentes y reduciendo el efecto de interferencias, ya que permite aumentar la detectabilidad, sensibilidad y especificidad en dichos análisis. Comparada con la espectroscopía convencional posee un gran valor ya que permite eliminar interferencias sin recurrir a técnicas separativas, más complejas y costosas. Ha encontrado amplia aplicación en muchos campos analíticos, particularmente en las ciencias farmacéuticas y bioquímicas ya que mantiene todas las leyes de la espectroscopía clásica (por ejemplo, la dependencia lineal del valor derivado respecto de la concentración de analito y la ley de aditividad).

Se expresa:

$dA/d\lambda$ Para la primera derivada;

$d^2A/d\lambda^2$ Para la segunda derivada

$d^nA/d\lambda^n$ Para una derivada de orden n de una función original $A=f(\lambda)$

Para una aplicación cuantitativa:

$(d^nA/d\lambda^n)_\lambda = (d^n\in/d\lambda^n)_\lambda\ b\ C$

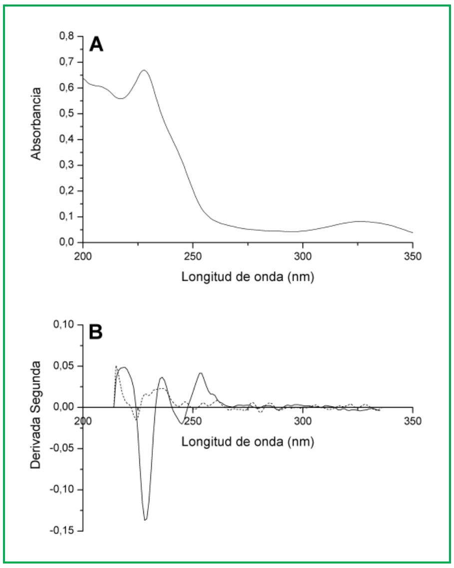


Figura 2. *Espectro de absorción de orden cero y de segundo orden de una sustancia determinada*

Los picos y valles de un espectro de orden *(n-1)*, se transforman en ceros en el espectro de orden *(n)*, mientras que por otra parte los puntos de inflexión de un espectro de orden *(n-1)* se transforman en máximos y mínimos del espectro de orden *(n)*. Los espectros derivados conducen por lo general a perfiles de bandas características, donde son observados sustanciales cambios en los gradientes y curvaturas, así como un comportamiento bipolar de los mismos. Por todo esto son utilizados ampliamente como herramienta de identificación de principios activos, además de la aplicación cuantitativa.

En estos métodos la señal se denomina "amplitud" o simplemente "derivada", en lugar de absorción y se puede medir considerando la distancia "cero-pico" (Z), "pico-pico" (P_1 y P_2) o por el método de la tangente (T) entre dos picos del mismo signo.

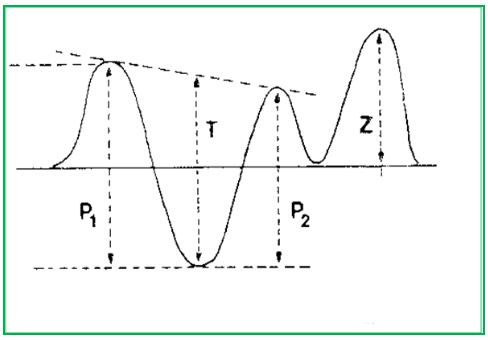


Figura 3. *Distintas alternativas de medición de la amplitud de un espectro derivado*

Una propiedad importante de los procesos derivativos es que las bandas anchas tienden a enangostarse o hacerse agudas cuando se incrementa el orden de la derivada, debido a que la amplitud de una banda es inversamente proporcional al ancho de la banda original, es decir a la banda de orden cero elevado al orden *n* de la derivada. Por lo tanto, cuanto mayor sea el orden de la derivada, más angosta será la banda del espectro derivado, como se puede observar en la siguiente figura.

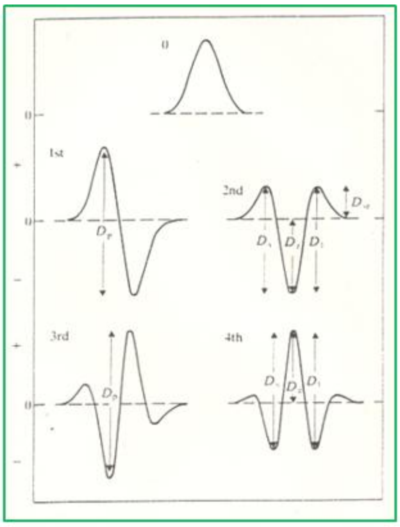


Figura 4. *Derivadas de orden creciente, hasta la cuarta derivada, de una sustancia*

Los métodos por espectroscopía derivativa son rápidos, simples, de baja contaminación ambiental y económicos comparados con los métodos cromatográficos, como el HPLC, por lo que pueden ser utilizados como una excelente alternativa en análisis rutinarios de control de calidad de medicamentos, así como en estudios de equivalencia farmacéutica y en algunos casos como métodos indicativos de estabilidad o para la determinación de productos de descomposición. Estos métodos presentan capacidad para resolver muestras de multicomponentes presentes en medicamentos y así eliminar las interferencias existentes, ya sea de alguno de sus otros componentes activos o de los propios excipientes que contenga la formulación (técnica llamada de los “ceros cruzados”). Esta técnica consiste en medir la amplitud de un componente en una mezcla, mientras los otros no dan señal a la longitud de onda de trabajo y en ese orden de derivada y luego repetir el

procedimiento pero a la inversa, es decir, que habrá que determinar tantos "ceros" como componentes tenga la muestra.

También se utiliza este recurso analítico para cuantificar principios activos que se encuentran en bajas dosis en una especialidad o que presentan espectros de absorción con bandas no bien definidas, ya que este método permite transformar los suaves cambios de pendientes de un espectro directo en bandas positivas o negativas más evidentes en el espectro derivado.

Cuando se desea desarrollar un método por espectroscopía derivativa, en primer lugar habrá que optimizar condiciones de trabajo como: elección del solvente de trabajo; orden de derivatización y longitud de onda de lectura. Posteriormente deberá ser validado, para ello se realizan las siguientes comprobaciones previas:

- No interacción de las drogas activas en la mezcla (para el caso de multicomponentes), para lo cual se debe verificar que la suma de las absorbancias a las distintas longitudes de onda, para el espectro de orden cero, concuerde con las de la mezcla.
- Comprobación de los "ceros cruzados": la señal obtenida (amplitud) en el cero de cada componente, a un determinado orden de derivada y a una determinada longitud de onda, debe ser función únicamente de la amplitud del otro componente y viceversa. Es decir, que la amplitud de la mezcla en el cero cruzado, será función solamente de uno de ellos, aquél que dé señal a esa longitud de onda en el espectro derivado. Para demostrar esta propiedad se debe trabajar con mezclas binarias de concentración constante del componente que da señal y concentraciones crecientes del de amplitud cero.

Estos tres requisitos que habrá que verificar son específicos de los métodos derivativos, además de ellos se deberá proceder a calcular los habituales parámetros de validación como linealidad, especificidad, precisión, exactitud, límite de detección, de cuantificación y robustez.

En general, los métodos para dar derivadas espectrales pueden ser: métodos ópticos, que operan sobre la radiación del mismo haz y métodos electrónicos o digitales, que actúan a la salida del detector fotométrico.

Espectroscopía Infrarroja

La espectroscopía infrarroja (IR) es de gran importancia en análisis de medicamentos porque puede aplicarse como técnica analítica cualitativa y cuantitativa, siendo la primera la de mayor aplicación. Puede detectar grupos funcionales cuya presencia sería imposible de determinar por ensayos químicos convencionales.

El espectro IR de una sustancia es característico de ella, por lo tanto la técnica de IR resulta útil para determinar la identidad de una sustancia.

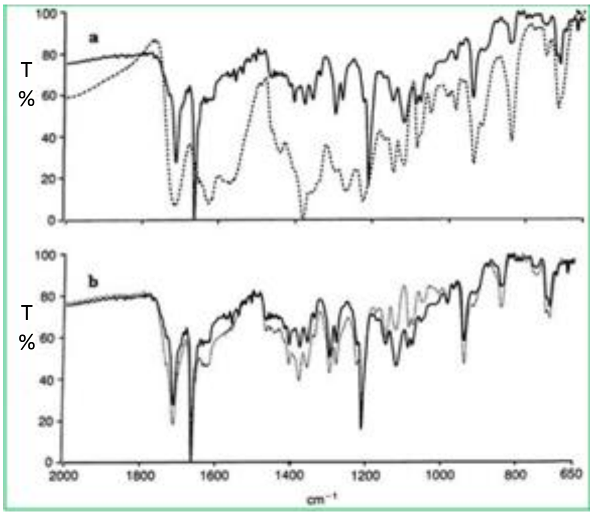


Figura 5. *Espectros IR típicos*

La región del IR se encuentra entre 0,70 – 200 µ que equivale a 700 – 200.000 nm y si lo expresamos en número de onda, que es la recíproca de la longitud de onda expresada en cm, sería entre 4000 – 700 cm^{-1}. A su vez esta región se divide en la región de frecuencias de grupo, entre 4000 – 1300 cm^{-1} y de las huellas digitales entre 1300 – 700 cm^{-1}. En esta región del espectro, pequeñas diferencias en la estructura y la constitución de las moléculas originan cambios importantes en la distribución de los picos de absorción. Como consecuencia, la estrecha correspondencia entre dos espectros en esta región constituye una evidencia de la identidad de los compuestos que producen los espectros.

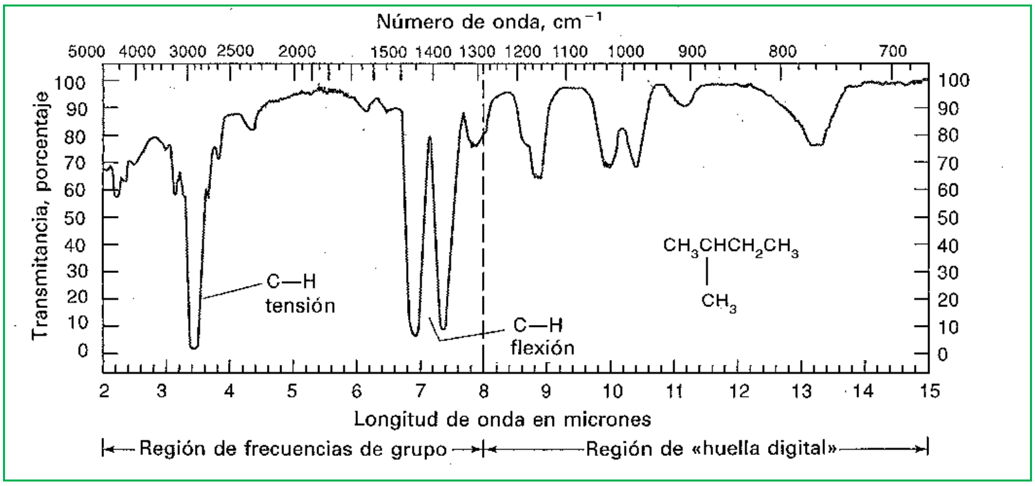


Figura 6. *Frecuencia de grupo y región de huella digital del espectro IR medio*

Las transiciones que se producen en el IR se deben a vibraciones de grupos de átomos, las que se originan en la región de las huellas digitales son características de una determinada sustancia. Las vibraciones características de átomos unidos covalentemente se clasifican en dos tipos, vibraciones de *tensión, valencia o estiramiento*, que suponen un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos, que a su vez pueden ser simétricas o asimétricas. Y por otro lado, vibraciones de *flexión o deformación*, que corresponden a cambios en el ángulo de enlace y que pueden ser de tijereteo, balanceo, aleteo y torsión, en el plano o fuera del plano. No todas las vibraciones serán activas en IR, sólo aquellas en las que se cambie el momento dipolar permanente de la molécula, como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación.

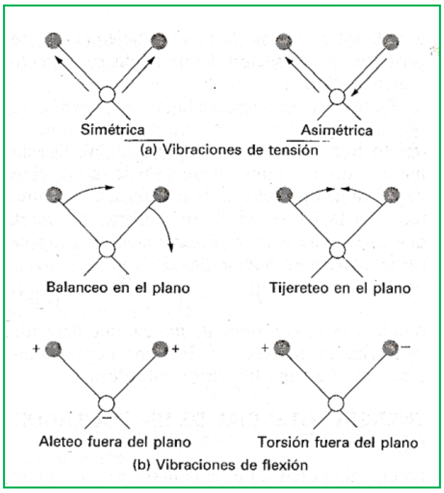


Figura 7. *Tipos de vibraciones moleculares*

Determinados grupos químicos dan bandas de vibración características, independientemente de la molécula a la que pertenezcan. El rango de números de onda en el que aparecen esas bandas se ve afectado por factores inter e intramoleculares, como por ejemplo la masa atómica de los grupos adyacentes, el acoplamiento mecánico entre grupos similares, la formación de puentes de hidrógeno, simetría, electronegatividad, conjugación, etc.

Los espectrofotómetros IR se basan en los mismos principios y diseños ópticos que los espectrofotómetros UV-VIS, excepto que en los instrumentos de IR el compartimento de la muestra y de la referencia siempre se colocan entre la fuente y el monocromador. Por otra parte los materiales de la óptica, prismas, ventanas, celdas, etc., deben ser de sales transparentes a la radiación IR, como son los halogenuros de metales alcalinos, especialmente BrK y ClNa.

La mayoría de los instrumentos modernos utilizan un microordenador con un software capaz de presentar la señal de salida en una variedad de formatos, tales como transmitancia vs. longitud de onda y absorbancia vs. número de onda o longitud de onda. La preferencia por la escala lineal de número de onda se debe a la proporcionalidad directa que hay entre esta magnitud y la energía o la frecuencia.

En la actualidad los equipos más modernos trabajan con el sistema de transformadas de Fourier que utiliza una técnica interferométrica, donde se utiliza un interferómetro en lugar de un dispositivo dispersante y un software para procesar los datos espectrales. Estos equipos permiten una mejor relación señal/ruido ya que la luz no debe pasar por un monocromador, se miden todas las frecuencias a la vez, lo que da mucha mayor rapidez, poseen elevada exactitud y reproducibilidad en la determinación de frecuencias y presentan una alta resolución, de menos de 0,1cm^{-1} y los espectros pasan necesariamente por una computadora lo que facilita el análisis y manejo espectral.

En IR es muy importante el método que se utilice para preparar la muestra. A diferencia del UV-VIS donde en la mayoría de los casos las muestras se obtienen a partir de disoluciones diluidas del analito, en IR no es sencillo repetir

esta práctica debido a que no existen buenos disolventes que sean transparentes en toda la región espectral.

En general podemos prepararlas de tres maneras distintas: en fase sólida, en fase líquida y en fase gaseosa.

Fase sólida. Las muestras se obtienen dispersando el analito en una matriz líquida o sólida. Estas técnicas requieren que el tamaño de partícula del sólido suspendido sea menor que la longitud de onda del haz IR, en caso contrario se pierde una parte de la radiación por dispersión.

Uno de los métodos utilizados consiste en triturar de 2-5 mg de una muestra finamente pulverizada (tamaño de partícula < 2µm) y suspenderlos en unas pocas gotas de un aceite pesado de un hidrocarburo (Nujol). Si es probable que interfieran las bandas del hidrocarburo se puede utilizar Fluorolobe, un polímero halogenado, donde los Hidrógenos se han sustituido por Flúor. En cualquiera de los dos casos la muestra resultante se examina luego como una película delgada entre dos placas planas de sal (ClNa). Esta preparación de la muestra es la recomendada para polimorfos.

Otra forma de preparar una muestra en fase sólida es partiendo de un miligramo de muestra finamente triturada que se mezcla con unos 100 mg de bromuro de potasio en polvo desecado. La mezcla se efectúa en un mortero y luego se comprime en un instrumento especial a una presión de 700-1000 Kg/cm^2, eliminando el aire ocluido mediante vacío, para obtener un disco muy delgado y transparente, luego este disco o comprimido se coloca en el haz del instrumento en un soporte adecuado.

Fase líquida. Si la muestra es líquida de por sí, es decir se trata de un líquido puro, se coloca una película muy delgada de dicho líquido entre dos placas de ClNa que se mantienen unidas por capilaridad y luego se colocan en la trayectoria del haz. Si la muestra es sólida hay que disolverla en un disolvente adecuado, como por ejemplo cloroformo, disulfuro de carbono o tetracloruro de carbono, aunque es evidente que no existe un solo disolvente que sea transparente en toda la región del IR. El agua y los alcoholes prácticamente no

se utilizan, no solo porque absorben intensamente, sino porque atacan a los haluros de metal alcalino de las cubetas. Las cubetas suelen ser muy estrechas, es decir con caminos ópticos muy cortos, frecuentemente son desmontables y para llenarlas o vaciarlas se utilizan jeringas hipodérmicas.

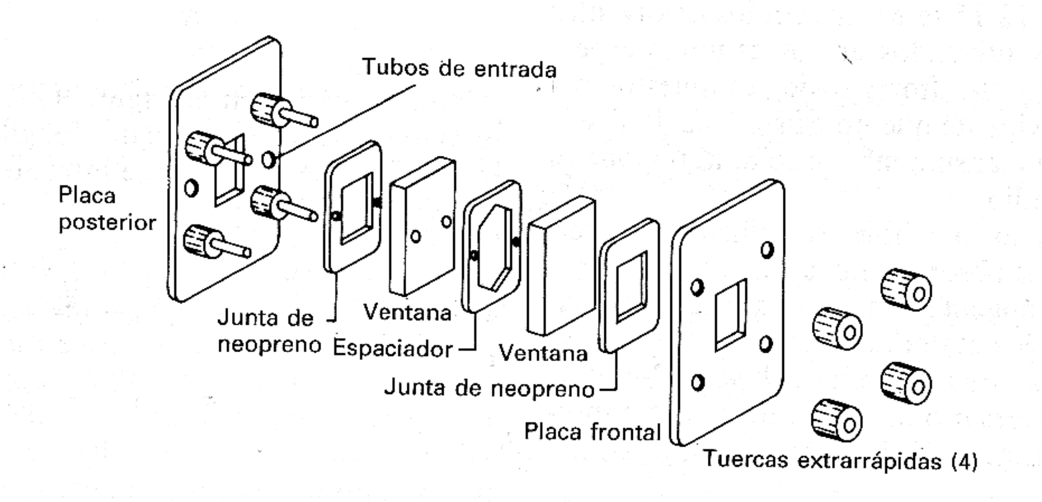


Figura 8. *Vista extendida de una celda desmontable para muestras líquidas*

Fase gaseosa. El espectro de un líquido de bajo punto de ebullición o de un gas, se puede obtener expandiendo la muestra en una cubeta en la que se ha hecho vacío. Existen diversas cubetas con este fin, con caminos ópticos mucho mayores (varios centímetros). No es un método de preparación de muestra muy utilizado en la actualidad.

Preguntas Orientadoras

1. Qué entiende por espectroscopía de absorción? Para qué se utiliza?
2. En qué se basa el análisis espectroscópico cuantitativo?
3. Qué es la absortividad? Unidades. Dependencias.
4. Qué tipo de desviaciones puede sufrir la ley de Beer?
5. Cuáles son los componentes básicos de un espectrofotómetro UV-VIS?
6. Cómo se cuantifican por UV multicomponentes?
7. Como se valida un método de Espectroscopía Derivativa?

8. Clasificación de las vibraciones al IR. Tipos de preparación de muestra.

Test de Autoevaluación

1. De cuál de estos parámetros depende la Absortividad de un principio activo en solución:
   (a) Concentración
   (b) Temperatura
   (c) Intensidad de la radiación
   (d) Longitud del camino óptico

2. En espectroscopía UV-VIS se trabaja a la $\lambda_{máx}$ porque:
   (a) El método es más exacto
   (b) El método es más preciso
   (c) El método es más lineal
   (d) El método es más sensible

3. De qué material son las cubetas de un espectrofotómetro ultravioleta:
   (a) Vidrio
   (b) Cloruro de sodio
   (c) Cuarzo
   (d) Polietileno

4. A qué técnica recurre para identificar un principio activo:
   (a) Espectrofotometría Infrarroja (IR)
   (b) Volumetría ácido-base
   (c) Extracción líquido-líquido
   (d) Potenciometría

5. Como se debe preparar una muestra de un polimorfo para analizarlo por Espectroscopía Infrarrojo:

(a) En solución clorofórmica

(b) Como comprimido con Bromuro de potasio

(c) En suspensión con Nujol

(d) En solución acuosa

Bibliografía

1. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VII ed. (2003) Buenos Aires.

2. Connors, K. A. (1980) *Curso de Análisis Farmacéutico*.

3. Skoog, D. A.; Leary, J.J. (1996) *Analisis instrumental.* Mc Graw-Hill, 4ª. Ed.

4. Conley R. T. (1979) *Espectroscopia infrarroja*. Ed. Alhambra.

5. Pradeau D. (1998) *Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos*. Uteha Noriega Editores.

6. Harris D.C. (2001) *Análisis Químico Cuantitativo*. Ed. Reverté S.A.

CAPITULO 7

MÉTODOS DE ANÁLISIS TÉRMICO

María Esperanza Ruiz

Introducción

La definición generalmente aceptada de análisis térmico (AT) abarca al grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de un sistema (sustancia o un material) en función de la temperatura, mientras se le somete a un programa de temperatura controlado. La representación gráfica de la propiedad media en función de la temperatura (o tiempo) se denomina *termograma*. Se pueden distinguir más de una docena de métodos térmicos que difieren en las propiedades medidas y en los programas de temperatura. Estos métodos encuentran una amplia aplicación tanto en el control de calidad como en investigación de productos farmacéuticos, arcillas y minerales, metales y aleaciones, polímeros y plásticos.

Durante el calentamiento o enfriamiento de los materiales cambia su estructura, estado o composición química. Estas transformaciones y reacciones están íntimamente relacionadas con el intercambio de calor entre la muestra y la atmósfera que la rodea. Los métodos térmicos proporcionan información sobre estos intercambios de calor y, por consiguiente, sobre un gran número de procesos físicos y fisicoquímicos que pueden tener lugar en la muestra: absorción, adsorción, desorción, quimisorción, hidratación, deshidratación, fusión, vaporización, sublimación, reacciones en estado sólido, transiciones entre estados polimórficos o pseudo-polimórficos, reacciones gas-sólido, descomposición, degradación, etcétera.

En el AT, el cambio de peso que sufre una muestra en función de la temperatura constituye la base de la termogravimetría (TG), mientras que la medida de los cambios de temperatura origina el análisis térmico diferencial (ATD), y si en lugar de temperatura se miden cambios de energía la técnica se

denomina calorimetría diferencial de barrido (DSC, se retiene esta sigla en inglés -*differential scanning calorimetry*- por ser la forma abreviada de nombrar a esta técnica, aún en idioma español). Así por ejemplo, la TG indica el momento y la magnitud de los cambios de peso de una muestra, mientras que el ATD y el DSC permiten determinar si una reacción o cambio físico es endotérmico o exotérmico, y, en el caso de DSC, también permite medir la variación de calor.

Las tres técnicas mencionadas son las más empleadas dentro del AT aunque no las únicas, ya que existen otra serie de propiedades que también pueden ser medidas aunque las técnicas a las que dan lugar sean de aplicación más limitada, como microscopía de platina caliente, análisis termomecánico, análisis de evolución de gases, termosonimetría, termoelectrometría, termometrías entálpicas, entre otras. Algunas de estas técnicas serán descriptas brevemente al final de este capítulo.

Termogramas

Tanto para el ATD como para DSC, los picos observados en los termogramas presentan varias temperaturas características que se emplean a la hora de describirlos:

- La temperatura de inicio (T_i) y la temperatura extrapolada de inicio (T_{ie}).
- La temperatura de pico (T_p)
- La temperatura de recuperación (T_r)

La Figura 1 muestra un esquema donde se pueden observar a qué parte de la curva corresponden cada una de dichas temperaturas (su determinación es igual tanto para picos endo como exotérmicos). La temperatura extrapolada de inicio corresponde a la intersección entre la línea de base previa al pico y la línea que surge de extrapolar el primer segmento del pico. En el caso de picos anchos o poco definidos, resulta conveniente determinar la temperatura de pico como la intersección entre las líneas extrapoladas de las curvas laterales de dicho pico.

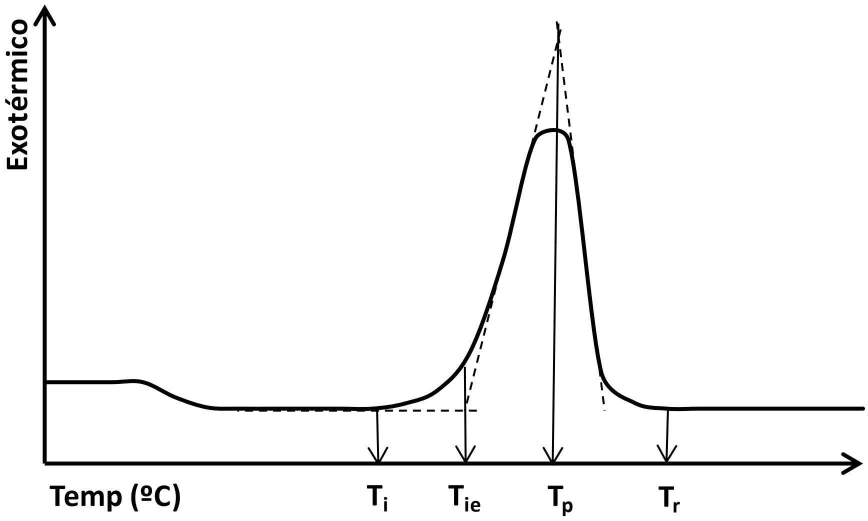


Figura 1. *Típica curva de análisis térmico en la que se distinguen la temperatura de inicio (T_i), de inicio extrapolado (T_{ie}), de pico (T_p) y de recuperación (T_r)*

Al inicio de una corrida, la temperatura de los pocillos correspondientes a la muestra y a la referencia pueden no ser idénticas, por lo que se suele observar una pequeño escalón, tanto endo como exotérmico, al principio de los termogramas, como se observa en la Figura 1.

Termogravimetría (TG)

En un análisis termogravimétrico se registra, de manera continua, la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada, cuando:

- Es sometida a un incremento continuo y lineal de temperatura (experimento dinámico)
- Es sometida a una temperatura dada, durante un cierto intervalo de tiempo (experimento isotérmico)

La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o de la temperatura genera el termograma o curva de descomposición térmica. En dicha curva se distinguen tramos horizontales o mesetas, en las que el peso permanece constante, y tramos donde una pendiente descendente indica la

velocidad de pérdida de peso.

Con frecuencia se usa una variante de esta técnica denominada *termogravimetría derivada* (TGD), que consiste en derivar los termogramas en función del tiempo o temperatura. Las curvas de TGD relacionan la velocidad de pérdida de peso con la temperatura. En estas curvas, los valores de ordenada cero (dP/dt = 0) corresponden a las mesetas del termograma original, mientras que los máximos coinciden con los puntos de máxima pendiente de los tramos descendentes. La TGD no es una técnica en sí misma ni aporta información adicional a la TG, pero sí permite lograr una mayor resolución que las curva de TG normal: las temperaturas/tiempos a los que se produce un cambio de masa se observan como un escalón en TG mientras que en TGD se ven como un máximo, lo que permite una determinación más exacta de su valor, como así también un pequeño hombro en la curva de TGD es una indicación de reacciones consecutivas que pueden pasar desapercibidas en la curva original.

En la Figura 2 se representan estos dos tipos de termogramas, TG convencional y diferencial.

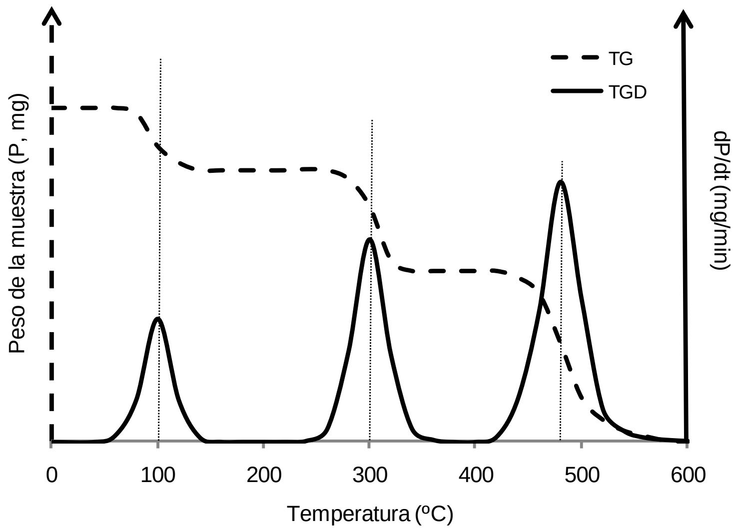


***Figura 2**. Termograma diferencial (curva inferior, eje derecho) y convencional (curva superior punteada, eje izquierdo)*

Descripción de equipo

Los instrumentos que permiten el registro continuo de las curvas termograviméntricas, es decir, la variación del peso de la muestra en función de la temperatura, se denominan *termobalanzas*. Suelen tener la posibilidad de variar la velocidad de calefacción y de registro, como así también de controlar la atmósfera en la que se encuentra la muestra (inerte, oxidante, reductora, vacío o alta presión).

La Figura 3 presenta un esquema de una termobalanza, donde se pueden observar sus tres partes principales: el horno, la balanza, y el sistema de registro para la adquisición y visualización de datos.

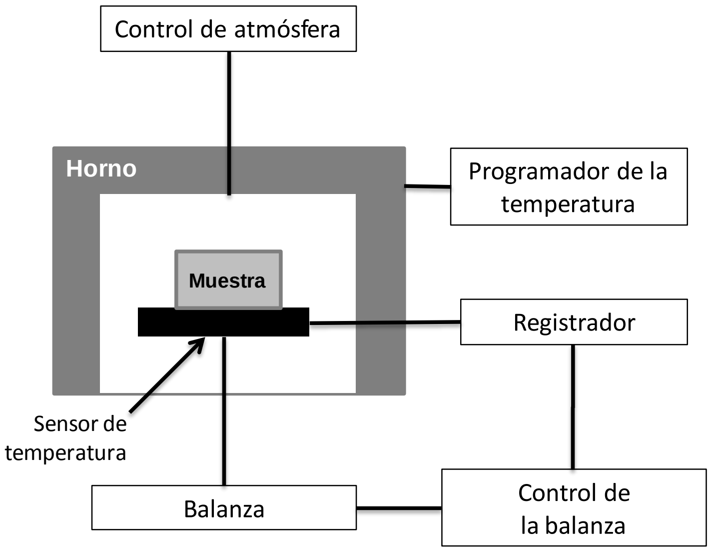


Figura 3. *Esquema de una termobalanza. El registrador, conectado a la termocupla que censa la temperatura del horno y a la balanza, registra la temperatura y el peso de la muestra, simultáneamente.*

La balanza debe poseer exactitud, precisión y sensibilidad adecuadas, además de buena estabilidad térmica y mecánica. Si bien el soporte de la muestra debe estar situado en el horno, el resto de la balanza debe estar aislado térmicamente del horno.

El horno es de material refractario, y contiene en su interior un crisol en el que

se coloca la muestra. El sistema calefactor eléctrico está controlado por un microprocesador que permite un incremento o disminución lineal de la temperatura de la muestra a velocidad regulable, desde aproximadamente cero hasta valores tan elevados como 200 ºC/min. En el interior del horno la temperatura debe ser lo más uniforme posible.

La temperatura registrada en un termograma es idealmente la temperatura real de la muestra. Esta temperatura puede, en principio, obtenerse introduciendo una termocupla pequeña en la muestra. Sin embargo, este procedimiento puede generar la descomposición catalítica de la muestra, su contaminación y/o errores de pesada. Es por ello que la temperatura se mide generalmente en un punto ubicado lo más cerca posible del contenedor de la muestra.

Existen equipos capaces de proporcionar información cuantitativa sobre muestras cuyas masas pueden llegar a los 100 g, si bien lo más común es trabajar en un intervalo entre 5 y 20 mg. El intervalo de temperaturas de trabajo también varía entre modelos, pero para análisis farmacéutico no se suele trabajar por encima de los 350 - 400 ºC.

La preparación de una muestra implica colocar la cantidad inicial de muestra sobre una cápsula de platino y luego colocar dicha cápsula dentro del horno. La propia termobalanza se utiliza para pesar la masa inicial de muestra.

Análisis térmico diferencial (ATD)

El análisis térmico diferencial o ATD se basa en la medida de la diferencia de temperatura (ΔT) entre la muestra y un material de referencia térmicamente inerte, mientras ambos son sometidos al mismo programa de temperatura. Mediante ATD se pueden detectar todos los procesos que involucren absorción o liberación de calor por parte de la muestra, lo que permite seguir sus cambios de fase o la existencia de determinadas reacciones químicas que tengan lugar durante el proceso. El ATD suele ser considerado inferior respecto a la técnica de DSC, debido a que sólo permite obtener información cualitativa de la muestra. Sin embargo, es una herramienta muy utilizada en análisis

farmacéutico por su capacidad para proveer información muy útil, como por ejemplo transiciones de fase.

El termograma de ATD consiste en la representación de ΔT en función de la temperatura de calentamiento. En la Figura 4 se observa una curva de este tipo: en las regiones planas de dicha curva, de pendiente cero, la energía provista por el calentador del equipo es utilizada, tanto por la muestra como por la referencia, para aumentar la temperatura, por lo que la temperatura en ambos pocillos será la misma y ΔT = 0. Cuando sucede una transformación endotérmica en la muestra (fusión por ejemplo), la energía aportada por el horno se empleará en dicha fusión y no en aumentar la temperatura, mientras que la referencia inerte sigue aumentado su temperatura junto con el horno, resultando entonces en un aumento del ΔT (hacia valores negativos, en este caso) entre ambos pocillos, hasta alcanzar un valor mínimo donde ΔT es máximo. Luego, cuando la masa de material absorbente de calor supera a la del material que se transforma, la muestra comienza a aumentar su temperatura y el sistema retorna a la línea de base cuando se iguala a la referencia. Si, por el contrario, sucede una transformación exotérmica, el pico observado será en el sentido contrario.

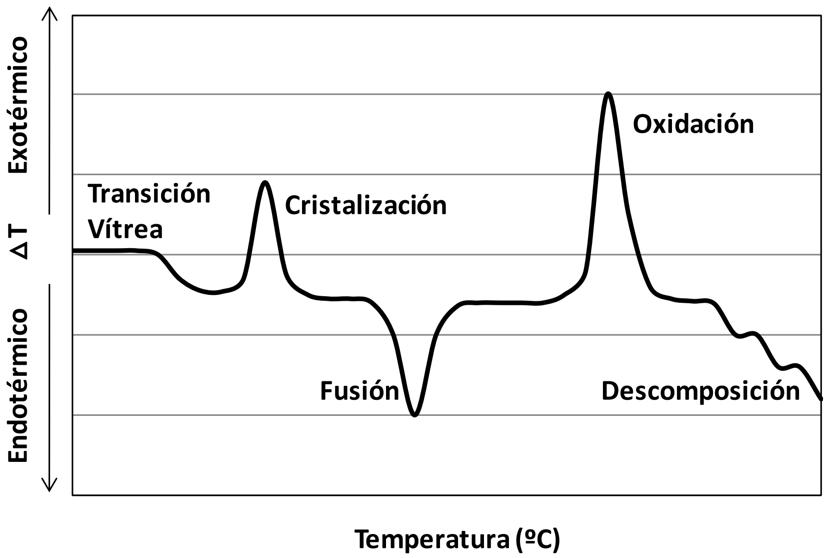


Figura 4. *Termograma de ATD*

El hecho de representar los procesos endotérmicos con picos hacia abajo y

exotérmicos hacia arriba es una convención, que si bien se respeta en la mayoría de los casos no evita que puedan encontrarse termogramas a la inversa.

En algunas ocasiones se observa que la línea base de gradiente de temperaturas sufre un desplazamiento transitorio o permanente después del pico, lo que indica un cambio en el calor específico de la muestra después de la reacción.

En principio, se trata de una técnica cualitativa que indica la temperatura a la cual tiene lugar el cambio energético en estudio y si el proceso es endotérmico o exotérmico. Las curvas DTA son características de cada sustancia, aunque están muy influidas por las condiciones experimentales a las que se obtienen. El área del pico en una curva DTA depende de la masa de muestra utilizada, de la entalpía de la reacción, y de una serie de factores adicionales como la geometría y la conductividad térmica de la muestra. Además, existe una constante de calibrado que depende de la temperatura, lo que significa que no es posible convertir directamente áreas de picos en unidades de masa o de energía a menos que se conozca el valor de esta constante para una determinada temperatura, de lo que se deduce la importancia de un buen calibrado en DTA.

Por lo tanto, con un adecuado calibrado es posible convertirla en semicuantitativa y obtener información del calor involucrado en el proceso.

Descripción del equipo

Un aparato típico de ATD se puede ver esquemáticamente en la Figura 5, e incluye un horno o sistema de calentamiento, con pocillos para la muestra y la referencia, un controlador diferencial de temperatura con su sistema de amplificación y registro asociado y los controladores de temperatura y atmósfera del horno. Al funcionar, el equipo mide la diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia (ΔT) en función de la temperatura del horno o temperatura programa (T_P).

El soporte de la muestra consiste habitualmente en un bloque de material inerte de alta conductividad térmica (acero inoxidable, aluminio, cobre, níquel, etcétera) en el que se ubican los pocillos de muestra y referencia. Esta última debe ser una sustancia tal que no sufra ningún cambio en el intervalo de temperatura de trabajo: alúmina, carburo de silicio, cuentas de vidrio, etc.

El conjunto se ubica dentro del horno, que se calienta de forma programada a medida que se registra su temperatura (T_P). Dicho horno también permite regular el tipo y presión del gas en contacto con la muestra. En contacto con los pocillos se ubican termocuplas que censan en todo momento la temperatura de muestra y referencia, y su diferencia ($\Delta T = T_R - T_M$).

Diferentes modelos comerciales pueden varían en cuanto al rango de temperatura de operación: son adecuados para el análisis farmacéutico equipos de alta sensibilidad y con un rango aproximado de -150 a 500 ºC. Otros equipos, por ejemplo aquellos que pueden alcanzar hasta 1600 ºC, resultan más adecuados para el análisis de materiales inorgánicos.

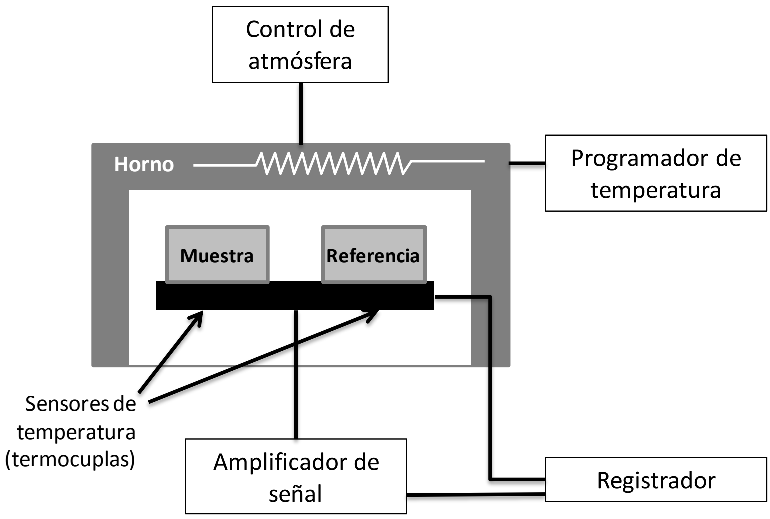


Figura 5. *Esquema de un equipo de ATD.*

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, *differential scanning calorimetry*) es un método directo y cuantitativo para la determinación del calor de

transformación y los cambios de entalpía. En esta técnica se realiza la medida de la diferencia de *cantidad de calor* entre una sustancia y una referencia en función de la temperatura de la muestra cuando ambas están sometidas a un programa de temperatura controlado. Permite el estudio de todos aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica, por lo que es útil para determinar calores específicos, puntos de ebullición y cristalización, pureza de compuestos cristalinos, entalpías de reacción y determinación de otras transiciones de primer y segundo orden.

Al igual que en ATD, la muestra y la referencia se alojan en dos pocillos idénticos que se calientan según un programa predeterminado, pero la diferencia fundamental con ATD es que en este caso el calentamiento de los pocillos se realiza mediante *resistencias independientes*. Esto hace posible emplear el principio de “balance nulo” de temperatura. Cuando en la muestra se produce una transición térmica (un cambio físico o químico que da lugar a una liberación o absorción de calor), se adiciona energía térmica bien sea a la muestra o a la referencia, con objeto de mantener ambas a la misma temperatura. Debido a que la energía térmica es exactamente equivalente en magnitud a la energía absorbida o liberada en la transición, el balance de energía proporciona una medición calorimétrica directa de la energía de la transición.

La técnica por DSC es similar al ATD y suministra una información semejante. La principal diferencia entre ambas radica en que en DSC en lugar de medir una diferencia de *temperaturas* entre la muestra y una referencia térmicamente inerte, se mide la *energía* que es necesaria suministrar a la muestra para mantenerla a idéntica temperatura que la referencia.

Descripción del equipo

Existen dos modelos comerciales de equipos de DSC:

1) DSC por flujo de calor. Esta técnica es una modificación del método de

ATD, en la cual se mide la diferencia de cantidad de calor entre la muestra y la referencia, cuando la temperatura de la muestra aumenta o disminuye linealmente.

2) DSC por compensación de potencia. La muestra y el material de referencia son calentados por calefactores separados, si bien sus temperaturas se mantienen iguales mientras las temperaturas se aumentan o disminuyen linealmente.

Con los dos métodos se obtienen resultados reproducibles y consistentes, y ambos proporcionan la misma información, aunque actualmente es más utilizado el de potencia compensada.

En la Figura 6 se muestra un esquema de un aparato de DSC de potencia compensada. Los pocillos que contienen la muestra y la referencia están equipados con un sensor (termocupla) para la medida de su temperatura, y una resistencia de calentamiento independiente para cada una de ellos. Estas resistencias mantienen ambos recipientes a una temperatura programada T_P. Las temperaturas instantáneas de cada pocillo (T_M y T_R) se miden y comparan continuamente con el valor programado T_P. El sistema trabaja de modo que la energía suministrada en cada momento por cada resistencia de calentamiento, es función de la diferencia entre las temperaturas de cada pocillo y la temperatura programada, es decir:

$$E_M = W_M \cdot (T_M - T_P) \qquad (1)$$

$$E_R = W_R \cdot (T_R - T_P) \qquad (2)$$

Donde E_M y E_R son las energías eléctricas suministradas por las resistencias, y W_M y W_R son constantes del sistema, que dependen de las características de cada material, como su masa y capacidad calorífica. La diferencia de energía ($\Delta E = E_M - E_R$) requerida para mantener los dos pocillos a la temperatura programada, es la cantidad que se representa en función de la temperatura (T_P, T_M o T_R), en el caso de experiencias dinámicas, o en función del tiempo a temperatura constante, en el caso de experiencias isotérmicas.

La mayoría de los equipos permiten operar en atmósfera inerte o reactiva (tanto oxidante como reductora), y algunos permiten incluso trabajar a altas

presiones. Los pocillos para muestra y referencia son generalmente de aluminio, descartables, con una capacidad que varía desde 0,1 – 100 mg, dependiendo de la densidad de la muestra. Normalmente estas cápsulas se sellan con una tapa de aluminio para impedir que por problemas de dilatación o descomposición de la muestra, ésta se proyecte fuera de la cápsula contaminando el equipo.

En el pocillo de referencia se puede colocar una sustancia inerte, igual que en ATD, o simplemente se puede dejar la cápsula vacía.

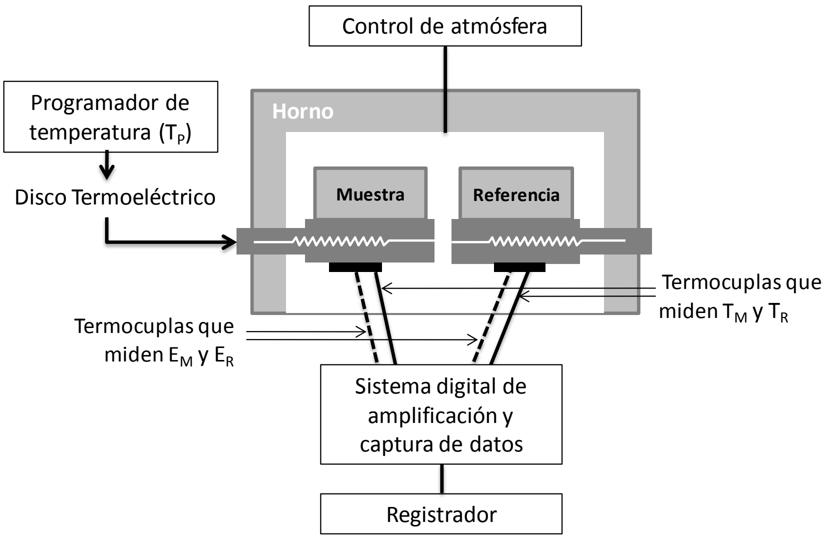


Figura 6. *Esquema de un aparato de DSC de potencia compensada.*

Los termogramas obtenidos son similares a los de ATD, pero en este caso el área bajo la curva de cada pico es proporcional a la energía requerida por la muestra para compensar el proceso endotérmico, o por la sustancia de referencia para igualar la energía emitida por la muestra cuando se trata de un proceso exotérmico. Aunque también es necesario realizar una calibración, en este caso es para determinar un factor de conversión eléctrico, que no depende de las características de la muestra.

En un equipo DSC bien diseñado, el valor de esta constante es independiente de la temperatura, lo cual explica el atractivo de esta técnica para determinaciones calorimétricas cuantitativas. Es posible determinar

directamente los cambios de entalpía de una reacción a partir de la masa de la muestra, la constante anterior y el área del pico correspondiente.

Calibración

El calor total correspondiente a la transformación producida en una muestra (ΔH_M) se determina a partir del termograma obtenido en el DSC. El coeficiente de calibración, K_H, es la constante de proporcionalidad que relaciona directamente el área A, que hay entre el pico de una curva y la línea base con el cambio de entalpía, es decir:

$$\Delta H_M - K_H \cdot A \qquad (3)$$

Para determinar K_H es necesario utilizar un material con calores de fusión perfectamente conocidos como muestra patrón. Con frecuencia se suelen utilizar metales de alta pureza como patrones de calibración. Los metales más utilizados para este fin son el Indio ($T_{fusión}$ = 429,8 ºK, $\Delta H_{fusión}$ = 28,4 J/g) y el Zinc ($T_{fusión}$ = 692,7 ºK, $\Delta H_{fusión}$ = 6,2 J/g). Determinando el área del pico de la muestra patrón se puede calcular K_H. El valor de K_H puede utilizarse entonces para determinar valores de entalpía de cualquier otra sustancia ya que no depende de la velocidad de calentamiento ni de la temperatura. Una vez calculado su valor, debe ser comprobado de forma regular.

Cuando se hace un barrido a una velocidad determinada dT/dt, la temperatura de la muestra aumenta (o desciende) linealmente, y el flujo de calor es:

$$\left({}^{dH}\!/_{dt}\right) = \left({}^{dH}\!/_{dT}\right) \cdot \left({}^{dT}\!/_{dt}\right) \qquad (4)$$

Es decir, el flujo de calor es proporcional a la velocidad de calentamiento (dT/dt) y a la capacidad calorífica (Cp = dH/dt). Por tanto las curvas de DSC pueden representarse en función de la capacidad calorífica.

Principales aplicaciones de los métodos de AT

La Tabla 1 resume algunos de los usos generales de las técnicas de AT.

Aplicación	TG	ATD	DSC
Punto de fusión	-	+	+
Análisis de solvatos			
Solvente ligado	+	+	+
Solvente adsorbido	+	+	+
Transición Vítrea	-	+	+
Calores de transición	-	+?	+
Determinación de pureza	-	+?	+
Análisis de incompatibilidades	+	+	+
Cinética de descomposición	+	+	+
Transiciones polimórficas	-	+	+

Tabla 1*. Resumen de las principales aplicaciones con relevancia en el análisis farmacéutico de los métodos de AT. (+): Aplicable, (-): No Aplicable, (+?): Potencialmente Aplicable.*

A. Análisis cualitativo e identificación, ya que los termogramas son muy característicos de un material.

B. Análisis cuantitativo. Mediante TG, los escalones correspondientes a las pérdidas de peso pueden ser utilizados para determinar la cantidad de cada componente en el material. Por otro lado, DSC puede emplearse como técnica cuantitativa, por ejemplo en la determinación de la pureza de un material.

Determinación de pureza: La determinación de la pureza de sustancias orgánicas por DSC se basa en el hecho de que la presencia de impurezas, aún en cantidades muy pequeñas, disminuye el punto de fusión a la vez que provoca el ensanchamiento del rango de fusión. Un ejemplo de esto se muestra

en la Figura 7, donde se el efecto del nivel de pureza sobre el termograma de DSC del principio activo Fenacetina.

Una vez conocida la constante K_H del equipo a utilizar, se puede calcular la pureza de un compuesto por aplicación de la ecuación de Van't Hoff:

$$\frac{1}{F_s} = \frac{\Delta H_m}{R} \cdot \frac{(T_0 - T_s)}{T_0^2} \cdot \frac{1}{X_2} \qquad (5)$$

Donde T_S es la temperatura instantánea de la muestra en el rango de fusión y T_0 es la temperatura de fusión de la sustancia pura, ΔH_m es la entalpía molar de fusión del material puro (J/g), X_2 es la fracción molar de impureza en la muestra, R es la constante de los gases (8,314 J/mol.ºC), y F_S es la fracción de fusión de la muestra a temperatura T_S. La fracción F_S se mide como A_S/A, donde A_S es el área bajo la endoterma de fusión hasta la temperatura T_S y A es el área total de la endoterma de fusión (ver Figura 7).

Tomando varios pares de valores (T_S, F_S) y graficando luego T_S vs. $1/F_S$ (gráfico de Van't Hoff) se obtiene una recta cuya pendiente corresponde a $[X_2.R.(T_0)^2]/\Delta H_m$. Por lo tanto, conociendo el valor de entalpía molar y la temperatura de fusión para la sustancia pura, es posible conocer la fracción de impureza en la sustancia que estamos analizando.

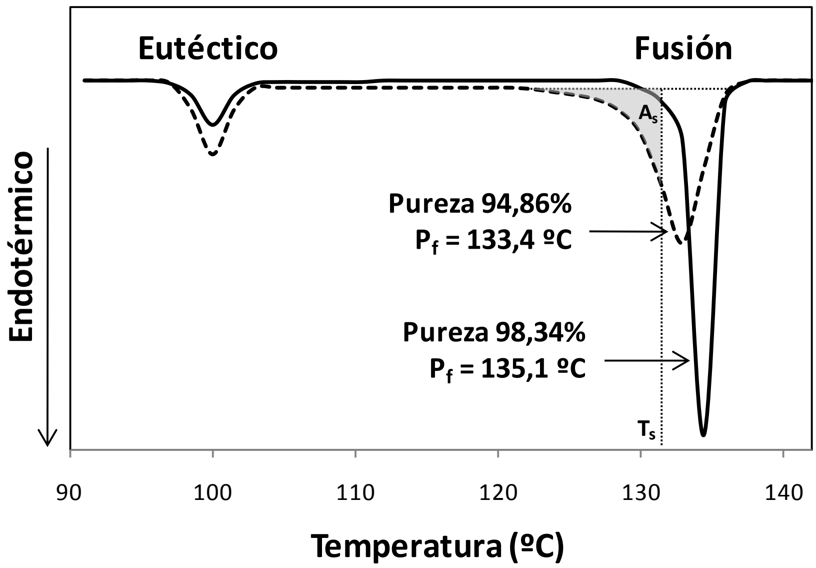


***Figura 7**. Termograma de DSC de la Fenacetina en dos grados de pureza. T_s es una temperatura instantánea de la muestra en el rango de fusión y A_s es el área bajo la endoterma de fusión hasta dicha temperatura T_s*

C. Determinación de constantes térmicas:

Punto de fusión: una transición de fusión sólo es instantánea o verdaderamente isotérmica en el caso de la situación ideal de materiales 100% puros. De lo contrario, se obtiene un rango de temperaturas donde ocurre la fusión, o "rango de fusión", del que se suele informar la temperatura inicial, es decir, aquella donde se comienza a detectar una fase líquida.

Punto de ebullición: muy pocos equipos comerciales son capaces de determinar esta temperatura. Además, como los calores de vaporización son mucho mayores a los de fusión, se requiere trabajar con tamaños de muestra menores, lo que a su vez genera pérdida de sensibilidad. En cuanto al valor informado, se toma la temperatura de inicio extrapolada como punto de ebullición de la muestra.

Temperatura de descomposición: toda descomposición, endo o exotérmica, se reflejará en un pico o señal tanto en DSC como en ATD. Por otro lado, si además la descomposición implica pérdida de masa (CO_2, por ejemplo), también podrá ser detectada mediante TG, y en dicho caso también podrá conocerse la estequiometria de la reacción.

Calores específicos y calores de transición: la determinación de este tipo de parámetros constituye uno de los usos principales de la técnica DSC.

D. Caracterización de materiales:

Temperatura de transición vítrea: muchos sólidos, cuando se calientan por encima de su punto de fusión y luego se enfrían rápidamente por debajo del mismo no cristalizan inmediatamente sino que forman un líquido sobre-enfriado. Dependiendo de la velocidad de enfriamiento, la recristalización puede ser retardada no sólo unos pocos grados centígrados sino incluso puede modificarse la capacidad calorífica del líquido sobre-enfriado inhibiendo así la posterior recristalización. Este fenómeno se conoce como "transición vítrea", y es el motivo por el cual siempre se deben emplear curvas de calentamiento (y no de enfriamiento) para determinar el punto de fusión. Los cristales vítreos son especialmente interesantes en el desarrollo farmacéutico debido a que por tratarse de un estado sólido energéticamente desfavorable presentan mayores velocidades de disolución.

Análisis de solvatos: los métodos de AT son muy útiles para el estudio de materiales que poseen solvente incorporado en el estado sólido, siendo los hidratos los más comunes. Al calentar, el solvente es liberado en una o varias etapas, las que se registran como endotermas en ATD y DSC, o como porciones descendentes en TG. A partir de ATD y DSC, se pueden calcular los calores de desolvatación, mientras que por TG se puede conocer la estequiometria del solvato.

En un trabajo realizado en 2012, Sorrenti *et al.* realizan la caracterización fisicoquímica de las formas sólidas de Clorhidrato de Tacrina monohidrato (TCR.H_2O), un inhibidor reversible de la acetilcolinesterasa, activo a nivel del sistema nervioso central, que se utiliza para el tratamiento de los síntomas leves o moderados del Alzheimer. En una parte de dicho trabajo, los autores estudian el efecto de la conservación de cristales de TCR.H_2O bajo distintas condiciones de humedad relativa (HR). La Figura 8 a continuación muestra los termogramas obtenidos por TG y DSC.

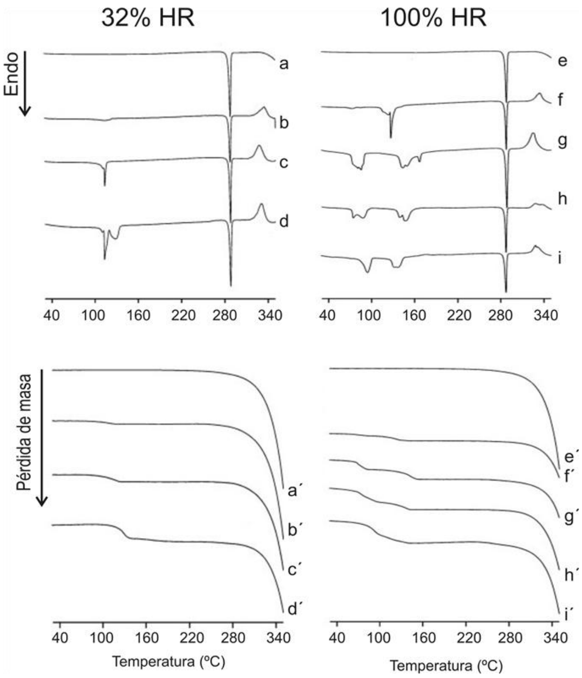


Figura 8*. Termogramas por DSC (gráficos superiores) y TG (inferiores) correspondientes a TCR anhidra expuesta a 32% de Humedad Relativa (HR, izquierda) y a 100% de HR (derecha). En el caso de 32% HR, los tiempos fueron t = 0 (a, a’), t = 10 días (b, b’), t = 20 días (c, c’), y t = 60 días (d, d’). En el caso de 100% de HR, los tiempos fueron t = 0 (e, e’), t = 1 h (f, f’), t = 24 hs (g, g’), t = 20 dlas (h, h’) y t = 40 días (i, i’). Adaptada de Sorrenti et al., Solid-state characterization of tacrine hydrochloride. J Pharm Biomed Anal 63, 53. Copyright 2011. Con permiso de Elsevier.*

La exposición de la forma anhidra de TCR (Figura 8, izquierda) a una HR 32% a temperatura ambiente, resultó en la hidratación gradual de la fase sólida anhidra hasta la completa transformación en la forma de monohidrato. Dicho monohidrato se caracteriza por un primer pico endotérmico de pérdida de solvente en el intervalo 150-160 °C, seguido de la fusión de la forma anhidra hasta descomposición a 290 °C.

Por otro lado, cuando la misma forma anhidra fue sometida a una HR 100%, se produjo la absorción de una mayor cantidad de agua, como se puede ver por los dos picos endotérmicos en las curvas de DSC (Figura 8 superior, derecha) correspondientes a dos pasos secuenciales de desolvatación en TG, típicos de la forma TCR.2H_2O (una primera eliminación cerca de 90 ºC y otra alrededor de 150 ºC, antes de la fusión con descomposición a 300 ºC). Más aún, la pérdida total de masa por TG luego de 40 días a 100% HR se corresponde con la estequiometria de la forma dihidrata, TCR.2H_2O

Estudio de polímeros: el análisis de la química de polímeros constituye una de las principales aplicaciones de los métodos de AT. Mediante ATD y DSC se obtiene información de la fusión, recristalización y transiciones vítreas. Por análisis de evolución de gases se puede conocer, por ejemplo, la estabilidad térmica de los polímeros, mientras que por análisis termomecánico se pueden estudiar fenómenos indetectables por otros métodos, como las transiciones líquido-líquido. La TG, por su parte, proporciona información sobre los mecanismos de descomposición de las preparaciones poliméricas. Además, los modelos de descomposición son característicos de cada tipo de polímero y, en algunos casos, pueden ser utilizados con finalidades de identificación. Todas estas y otras aplicaciones del AT al estudio de polímeros no serán tratadas en este capítulo, pero se puede encontrar extensa literatura sobre el tema.

E. Cambios estructurales, que tienen lugar en las transiciones sólido-sólido, y que pueden ser endotérmicos o exotérmicos. Los picos correspondientes en las curvas de ATD o DSC son generalmente reproducibles, considerándose como la huella dactilar del elemento en estudio.

Transiciones polimórficas: El AT y los métodos calorimétricos ofrecen grandes ventajas para el estudio del polimorfismo y pseudo-polimorfismo, que es una parte importante de los estudios de preformulación. La distinción entre el polimorfismo y pseudo-polimorfismo es fácil y el número de formas en las mezclas puede deducirse por análisis combinado de DSC y TG.

En algunos casos se puede observar un pico endo o exotérmico en DSC correspondiente a la transición sólido-sólido entre dos formas polimórficas, sin pérdida de masa en TG. En otros casos, se pueden observar dos puntos de fusión, el primero correspondiente al polimorfo de menor punto de fusión y el segundo al de mayor punto de fusión, que se forma por recristalización del líquido en la forma más estable (entre ambos picos aparece otro exotérmico indicando el evento de recristalización). Por otro lado, en el caso de pseudo-polimorfismo (hidratos o solvatos), éstos también pueden detectarse fácilmente por AT, principalmente por TG combinada con DSC, ya que la desolvatación o deshidratación constituyen evento endotérmicos.

F. Análisis de incompatibilidades

Incompatibilidades entre principios activos y excipientes: constituye uno de los principales usos del AT en análisis farmacéutico, mediante el estudio de interacciones en estado sólido realizando los termogramas de los componentes solos y de mezclas binarias activo-excipiente.

Las proporciones de cada componente (principio activo:excipiente) en las mezclas pueden variar, pero existen valores recomendados según la categoría funcional de cada excipiente: 1:5 para diluyentes, 3:1 para aglutinantes o disgregantes, 5:1 para lubricantes, 10:1 para colorantes, etc.

Una vez realizados los termogramas de los componentes solos y de las mezclas binarias (se pueden hacer tanto en condiciones normales de trabajo como en condiciones de estrés térmico), se analizan comparativamente los resultados para detectar posibles interacciones. Cabe aclarar que, en caso de observar una interacción, ésta no necesariamente implicará incompatibilidad, sino que debe estudiarse luego por otros métodos (cromatográficos, por

ejemplo) el fundamento de dicha interacción (qué está pasando) para finalmente decidir si te trata de una incompatibilidad o no.

En un trabajo muy interesante realizado en el año 2003 por Araújo *et al.*, se presenta el estudio de posibles interacciones entre el principio activo antirretroviral Zidovudina (AZT) y varios excipientes mediante el uso de TG y DSC. Las Figuras 9 y 10 muestran los termogramas por DSC.

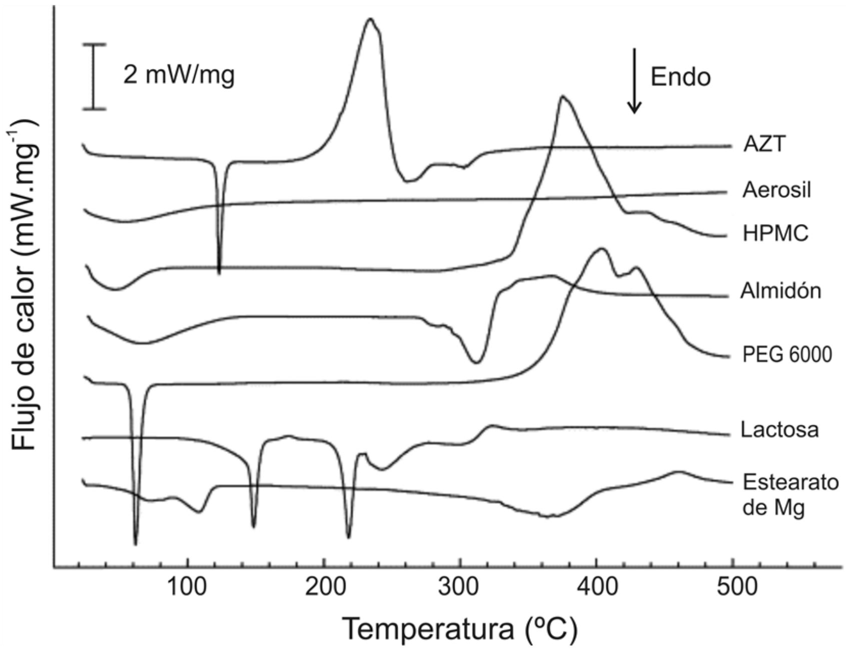


Figura 9. *Termogramas de DSC del principio activo AZT y los excipientes en estudio, obtenidos bajo atmósfera dinámica de nitrógeno (50 ml/min) a una velocidad de calentamiento de 10 ºC/min. Adaptada de Araújo et al., Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. Int J Pharm 260, 303. Copyright 2003. Con permiso de Elsevier.*

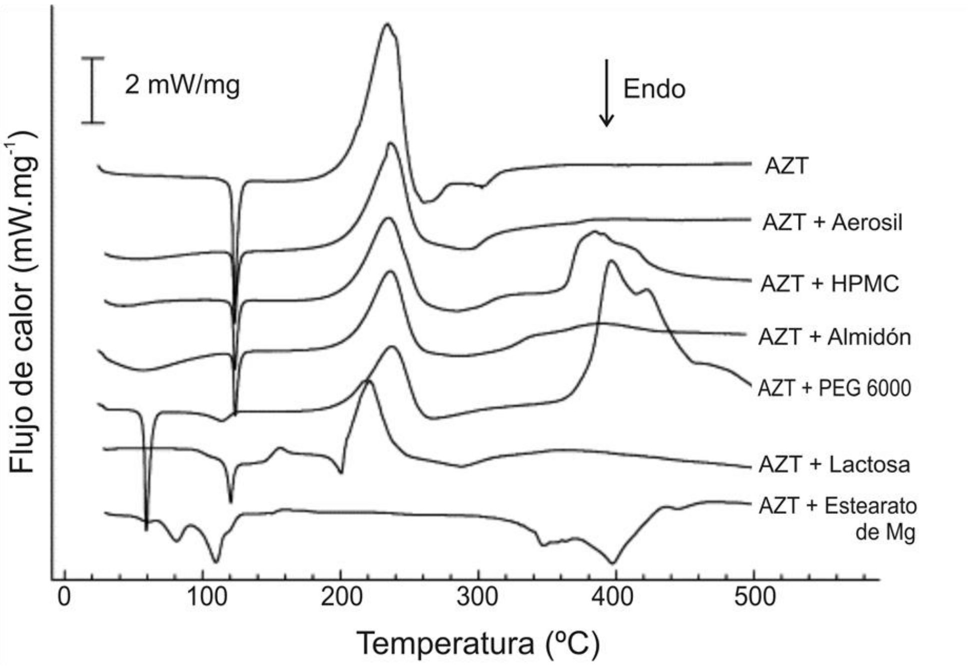


***Figura 10**. Termogramas de DSC de mezclas binarias 1:1 de AZT más excipientes, obtenidos bajo atmósfera dinámica de nitrógeno (50 ml/min) a una velocidad de calentamiento de 10 ºC/min. Adaptada de Araújo et al., Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. Int J Pharm 260, 303. Copyright 2003. Con permiso de Elsevier.*

En el caso de AZT, se observan dos picos principales: un primer pico endotérmico, correspondiente a la fusión (120–124 ºC, T_i= 122,6 ºC; ΔH=123,6 J/g) y dos picos posteriores, correspondientes a la descomposición térmica. El primero de ellos representa un evento exotérmico entre 180–250 ºC con un elevado valor de entalpía (905 J/g), mientras que el segundo es un evento endotérmico en el rango 250-355 ºC (ΔH=165 j/g).

Observando los gráficos anteriores, como así también los termogramas por TG presentes en el trabajo original, los autores concluyen que sólo existe una interacción significativa entre AZT y PEG600, ya que en la mezcla binaria de ambos desaparece el pico correspondiente a la fusión del AZT y sólo se observa el pico de fusión del PEG600 a 62 ºC.

Esto es un claro ejemplo de una interacción que no necesariamente implica incompatibilidad, ya que si bien la desaparición del pico de fusión del fármaco es indicativa de una interacción fuerte, la misma puede atribuirse a la disolución

del fármaco en el polímero fundido 62 ºC, lo que difícilmente se observaría en las condiciones normales de uso del medicamento.

Otros métodos térmicos

La ***microscopía de platina caliente,*** también conocida como microscopía termoelectrónica, se utiliza para estudiar mediante observación la naturaleza de eventos exo o endotérmicos, ya que consiste en colocar el portaobjetos con la muestra sobre una platina capaz de variar su temperatura en forma lineal y programada. Una vez iniciado el programa de temperatura, se puede observar directamente la muestra o grabar las imágenes con un software adecuado. Así, es posible correlacionar los cambios que se detectan por TG, ATD y/o DSC con las modificaciones de la muestra.
Por ejemplo, se puede observar la descomposición de una muestra con producción de gas o la pérdida de agua de cristalización a partir de un hidrato simplemente colocando cristales de la muestra en un aceite inerte (silicona, por ejemplo) y observando su evolución a lo largo de un programa de temperatura.

El ***análisis termomecánico*** permite medir los cambios de dimensión que sufre una muestra (tales como expansión o contracción) cuando es sometida a un programa de temperatura, o en función del tiempo cuando se mantiene la temperatura constante (experimento isotérmico).

El ***análisis de evolución de gases*** es una técnica que se utiliza para identificar la naturaleza de los gases o vapores producidos durante una descomposición térmica. Es una técnica altamente específica y muy costosa, ya que requiere acoplar los equipos de DSC, ATD o TG a un espectrómetro de masas o infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).

La ***termosonometría*** consiste en medir el sonido producido durante el cambio en materiales cristalinos sometidos a un programa de enfriamiento o

calentamiento. Dicho sonido puede ser producido por la propagación de rajaduras en el cristal que se pueden originar por estrés térmico o por la producción de gases o vapores (por ejemplo, pérdida de solvente de cristalización). La cristalización a partir de un material fundido también puede producir señales sonoras.
No se trata de una técnica cuantitativa, pero permite el estudio de fenómenos que a veces son indetectables por DSC o ATD, y así caracterizar con mayor detalle la naturaleza del material en estudio.

Las ***termometrías entálpicas*** se basan en registrar las variaciones de temperatura de una solución de la muestra problema cuando la misma se valora, en condiciones adiabáticas y en presencia de una termocupla, con un reactivo adecuado. La Figura 11 (a y b) muestra las curvas típicas que se obtienen según la reacción entre la muestra y el valorante sea endotérmica o exotérmica, respectivamente.

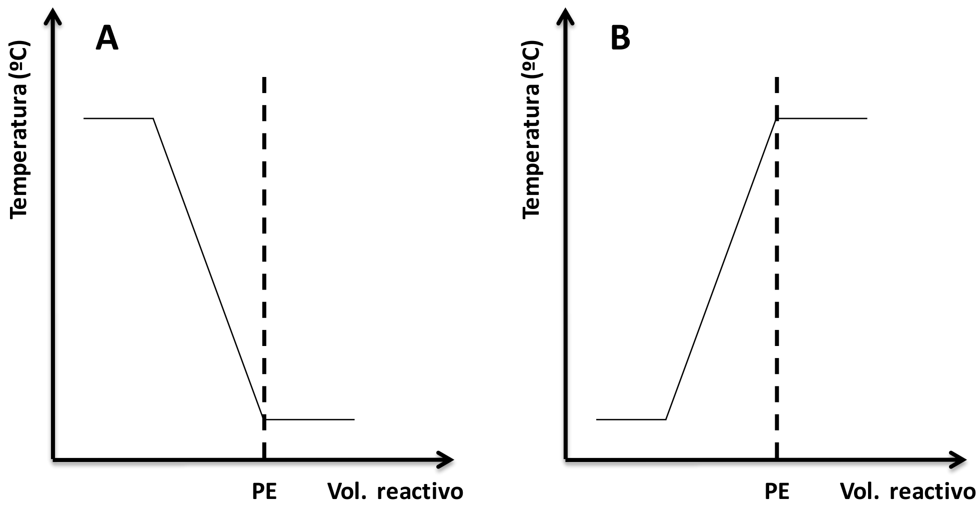


Figura 11. *Curvas termométricas entálpicas. a) Endotérmica. b) Exotérmica. PE: Punto de equivalencia.*

Antes de la adición de reactivo el gráfico es horizontal, y al comenzar la reacción por adición del reactivo se produce un salto (endo o exotérmico) hasta

que se completa dicha reacción. El gasto de reactivo hasta el punto de equivalencia permite conocer la concentración de la muestra problema.
Las termometrías entálpicas se han utilizado en la valoración de calcio en presencia de magnesio, de resinas de intercambio iónico, de EDTA y de otras sustancias formadores de complejos.

Otras técnicas tales como **termooptometría** (estudio de la variación de alguna propiedad óptica de la muestra durante el tratamiento térmico), **termoelectrometría** (estudio de la conductividad eléctrica en función de la temperatura), **termofotometría, termomagnetometría** y **análisis térmico de emanaciones** son procedimientos sumamente específicos y raramente usados para el análisis farmacéutico, por lo que no serán descriptos aquí.

Preguntas Orientadoras

1. ¿En qué se basan todos los métodos de análisis térmico (AT)?
2. Describa el fundamento y principales características de una termobalanza.
3. ¿Cuáles son las principales aplicaciones de la TG en el análisis farmacéutico?
4. Fundamento y equipamiento de la técnica ATD.
5. Fundamento y equipamiento de la técnica por DSC.
6. ¿Cuál es la principal diferencia entre ATD y DSC?
7. Explica el fundamento del empleo de DSC como técnica cuantitativa, y la manera de hacerlo (calibrado del equipo).
8. Enumera las principales constantes térmicas que pueden obtenerse mediante AT, y cuál es la técnica de elección para cada una de ellas.
9. Si Ud. posee una sustancia que puede encontrarse tanto en forma anhidra como mono o dihidrato, ¿qué técnica escogería para establecer de qué forma se trata? Indique brevemente cómo se vería el termograma en cada caso.

10. Uno de los principales usos del AT en la etapa de preformulación consiste en el análisis de incompatibilidades. Describe una manera de llevar a cabo dicho análisis, y cómo se interpretan los resultados.

Test de Autoevaluación

1. ¿Cuál de los siguientes fenómenos no podría ser estudiado por TG?
   (a) Pérdida de solvente
   (b) Descomposición con liberación de CO_2
   (c) Transición polimórfica sólido-sólido
   (d) Hidratación del sólido

2. ¿Cuál es la principal diferencia instrumental entre ATD y DSC?
   (a) El material que forma el horno
   (b) El sistema programador de temperatura
   (c) La manera de calentar los pocillos de muestra y referencia
   (d) El material utilizado como referencia

3. Si un principio activo se deshidrata a T_1, funde a T_2 y se descompone completamente a T_3 (con producción de CO_2), cómo cree Ud. que se verá su termograma por ATD:
   (a) Un pico endotérmico a T_1, uno exotérmico a T_2 y ninguna señal a T_3
   (b) Un pico endotérmico a T_1, otro endotérmico a T_2 y exotérmico a T_3
   (c) Un pico endotérmico a T_1, otro endotérmico a T_2, otro exotérmico a T_3 seguido por una caída de la línea de base
   (d) Un pico endotérmico a T_1, otro endotérmico a T_2 y una caída de la línea de base a partir T_3

4. Para el mismo principio activo de la pregunta anterior, cómo cree Ud. que se verá su termograma por TG:
    (a) Tres escalones sucesivos descendentes a T_1, T_2 y T_3
    (b) Solamente un escalón descendente a T_1
    (c) Un escalón descendente a T_1, nada a T_2 y otro escalón descendente a T_3
    (d) Ninguna de las anteriores

5. Al realizar un análisis de incompatibilidad entre un principio activo y varios excipientes, Ud. encuentra que para la mayoría de las mezclas binarias no se producen cambios en los termogramas, excepto con un excipiente, con el que observa que no aparecen los picos característicos del principio activo. ¿Qué medidas tomaría a continuación?
    (a) Descartaría ese excipiente
    (b) Repetiría el análisis de incompatibilidad, tal vez en otra condición de humedad relativa o de temperatura
    (c) Repetiría el análisis de incompatibilidad, pero cambiando la proporción principio activo:excipiente.
    (d) Trataría de dilucidar el mecanismo de la interacción mediante otras técnicas analíticas

Bibliografía

1. Wendlandt WW. (1986) *Thermal analysis*. John Wiley &Sons, 3rd ed: London, 814 pp.

2. Ford JL, Timmins P. (1989) *Pharmaceutical thermal analysis: techniques and applications*. Ellis Horwood, Chichester, 313 pp.

3. Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of pharmaceutical technology. Volume 15 (1997) *Thermal analysis of drugs and drug products to unit processes in pharmacy: fundamentals*. Marcel Dekker, New York, 446 pp.

4. Araújo AAS, Storpirtis S, Mercuri LP, Carvalho FMS, Filho MdS, Matos JR. (2003) *Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms*. International Journal of Pharmaceutics 260: 303-314.

5. Sorrenti M, Catenacci L, Bruni G, Luppi B, Bigucci F, Bettinetti G. (2012) *Solid-state characterization of tacrine hydrochloride*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 63: 53-61.

6. Suitchmezian V, Jeß I, Näther C. (2006) *Crystal structures and properties of two new pseudopolymorphic modifications of the glucocorticoide triamcinolone diacetate.* Solid State Sciences 8: 1373-1379.

7. Giron D. (1986) *Applications of thermal analysis in the pharmaceutical industry.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 4: 755-770.

8. Giron D. (1995) *Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates*. Thermochimica Acta 248: 1-59.

CAPITULO 8

DETERMINACIÓN DE AGUA

Claudia Marano

Introducción

El agua merece especial atención porque usualmente se debe indicar el contenido de humedad de una muestra analítica. En las muestras liquidas, el agua puede considerarse como diluyente o como impureza.

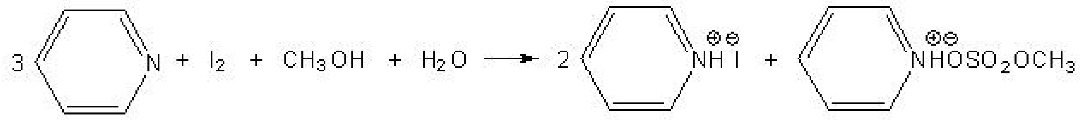
Las sales de ácidos inorgánicos y orgánicos así como otros compuestos cristalinos pueden retener agua de diferentes formas:

- Agua enlazada
- Agua adherida o libre

El agua libre (no enlazada) es humedad adsorbida en la superficie del sólido, y el agua enlazada es agua de cristalización (agua de hidratación). Por consiguiente, se tiene al agua libre como una impureza, mientras que el agua enlazada, aunque en realidad es un diluyente, de hecho forma parte de la estructura del cristal.

Determinación de agua por el método de Karl Fischer

La determinación de agua por el método de Karl Fischer se basa en la reacción cuantitativa entre el agua y un reactivo constituido por dióxido de azufre y yodo en presencia de metanol y una base orgánica como Piridina según la siguiente ecuación:



Existen dos métodos diferentes basados en la reacción con el Yodo:

- *Titulación volumétrica*: El yodo se disuelve en el reactivo y el contenido de agua es determinado midiendo la cantidad de yodo consumido como resultado de la reacción con el agua. Según el procedimiento empleado puede ser:

  - *Titulación volumétrica directa*

  - *Titulación Volumétrica por retorno.* En la titulación por retorno se agrega un exceso de reactivo, se espera un tiempo suficiente para que la reacción se complete y se titula el exceso de reactivo con una solución estándar de agua en metanol.

- *Titulación culombimétrica*: El yodo es producido por la electrólisis de un reactivo de Karl Fischer que contiene el ion yoduro. El contenido de agua en una muestra se puede determinar midiendo la cantidad de electricidad que se requiere para producir yodo durante la titulación.

$$2I^{\ominus} \longrightarrow I_2 + 2e^{\ominus}$$

El sistema de producción de yodo se compone de un ánodo y un cátodo, separados por un diafragma. Se determina la cantidad de electricidad, C = intensidad de corriente (A) x tiempo (s), requerida para la producción de yodo durante la titulación y se calcula el contenido de agua (%) en la muestra, por la fórmula siguiente:

$$\%H_2O = \left[\frac{C}{10.72 \times P}\right] \times 100$$

C = *Cantidad de electricidad requerida para la producción de yodo*

10,72 = *Cantidad de electricidad requerida para producir Iodo por 1 mg de agua*

P = *Peso de muestra.*

La reacción con el agua se desarrolla en dos pasos, la primera reacción es reversible y la piridina fuerza la posición del equilibrio hacia la derecha combinándose con el IH producido. La piridina también incrementa la estabilidad formando complejos de transferencia de carga con yodo y dióxido de azufre del reactivo.

Pueden ocurrir numerosas reacciones secundarias, consumiendo reactante. Las relaciones molares aproximadas en la preparación del reactivo de Karl Fisher son:

$$1\ I_2 : 3\ SO_2 : 10\ C_5H_5N$$

la fuerza del reactivo queda limitada a su contenido de yodo. La misma se expresa en mg de agua equivalente a 1 ml de reactivo y decrece rápidamente debido al consumo de yodo en las reacciones secundarias y deberá ser valorado periódicamente.

El reactivo se estandariza con cantidades conocidas de agua o con estándares primarios hidratos cristalinos (por ejemplo tartrato de sodio). Tales estándares deben cumplir con algunos requisitos:

- Ser comercialmente asequibles en calidad de reactivo de grado puro y poseer el contenido teórico de agua.

- Liberar cuantitativamente su agua por reacción con el reactivo de Karl Fisher en solución metanólica y no experimentar reacciones colaterales con el reactivo.

- Ser estables y no absorber humedad atmosférica en las condiciones ordinarias de almacenaje de un laboratorio.

- Se ha de poder determinar con exactitud su contenido de agua con un método independiente.

Dada la toxicidad de la piridina y el hecho de obtener mayor imprecisión en los resultados (la piridina no se acopla perfectamente ya que debido a su débil basicidad y su poca afinidad por el anión $CH_3SO_3^-$ la velocidad de la reacción es muy lenta y el punto final de la valoración inestable), en la actualidad es remplazada por otras bases con mayor eficacia como por ejemplo el imidazol

que ha resultado ser la mejor base para la reacción de Karl Fisher ya que asegura una valoración rápida y exacta.

$$CH_3OH + SO_2 + R\ddot{N} \longrightarrow R\overset{\oplus}{N}H\ S\overset{\ominus}{O_3}CH_3$$

$$R\overset{\oplus}{N}H\ S\overset{\ominus}{O_3}CH_3 + H_2O + I_2 + 2R\ddot{N} \longrightarrow R\overset{\oplus}{N}H\ S\overset{\ominus}{O_4}CH_3 + 2(R\overset{\oplus}{N}H)\overset{\ominus}{I}$$

$R\ddot{N}$: Base

La segunda reacción es la reacción de óxido-reducción propiamente dicha. El anión del ácido metilsulfónico es oxidado a metilsulfato y el iodo reducido a yoduro. Esta reacción es instantánea y consume una molécula de agua por molécula de yodo.

La primera ecuación produce un producto intermedio del dióxido de azufre este último forma con el alcohol (habitualmente metanol) un éster, el anión del ácido metilsulfónico $CH_3SO_3^-$ que es rápidamente neutralizado y estabilizado por la base. Esta reacción determina e impone su velocidad a la reacción de Karl Fisher. Es decir, es de gran importancia la base utilizada.

La reacción de Karl Fisher tiene un rango óptimo de pH entre 5-7 en el cual el curso de la reacción es rápido y estequiométrico.

Las valoraciones volumétricas se utilizan preferentemente en la determinación de grandes cantidades de agua 1-100 mg de agua.

La culombimétrica es un micro-método adecuado en determinaciones de 1 µg-10 mg de agua.

Precauciones

- Es obligatorio que la bureta, la botella de almacenamiento y todas las conexiones estén perfectamente secas, el agua que puede haber en dichos lugares conduciría a resultados erróneos.

- El reactivo debe almacenarse en un sitio frío, protegido de la luz y la humedad.

Estandarización del reactivo.

El reactivo de Karl Fischer preparado por alguno de los métodos existentes, debe estandarizarse antes de cada uso, porque su actividad para la determinación de agua cambia con el tiempo.

Para la determinación de contenidos de agua mayores al 1% el reactivo puede estandarizarse con agua, exactamente pesada. El cálculo del Título del Reactivo, correspondiente a la cantidad de agua, en mg por ml de reactivo, es el siguiente

$$F = P/V$$

P: Cantidad de agua expresada en mg

V: volumen en ml de reactivo consumido en la titulación.

Para la determinación de agua menores al 1% el reactivo puede estandarizarse con tartrato de sodio ($C_4H_4Na_2O_6.2H_2O$). El cálculo del factor de equivalencia, correspondiente a la cantidad de agua, en mg, por ml de reactivo, es el siguiente:

$$F = 2(18{,}02/230{,}08)(P/V)$$

Peso Molecular de agua: 18,02

Peso Molecular del tartrato de sodio di hidratado: 230,08

P: Peso en mg del tartrato

V: volumen en ml de reactivo consumido en la titulación

Técnica

Adición del solvente: en el vaso de valoración se añaden 20-30 ml de solvente (Ejemplo: metanol) dependiendo del tamaño de la muestra y de la celda, cerrar la celda para evitar al máximo la entrada de agua.

Pre-valoración: Se utiliza para eliminar el agua del disolvente y la humedad adherida dentro del recipiente.

Pesada de la muestra: El tamaño de la muestra depende de la cantidad de agua que contenga, del volumen de la bureta, del título del reactivo y de la exactitud deseada, es aconsejable utilizar la mitad del volumen de la bureta. ej: con una equivalencia de 5 mg H_2O/ml y una bureta de 20 ml una cantidad óptima de muestra será la que contenga 50 mg de agua.

Valoración del agua: Introducida la muestra se debe valorar inmediatamente, la velocidad de agregado del reactivo inicialmente es más rápida disminuyendo cerca del punto final. Una determinación clara del punto final es tan importante como la prevaloración.

Ensayo blanco: Este ensayo se realiza bajo las mismas condiciones que la muestra.

Cálculos: Una vez alcanzado el punto final debe leerse en la bureta el volumen de reactivo utilizado.

$$\%H2O = (V_x F/P)x100$$

dónde:

F: título del reactivo (mg H_2O/ml)

V: volumen de reactivo

P: peso de muestra en gramos

Es necesario realizar una serie de valoraciones a las cuales se debe determinar la media y su desviación estándar.

Indicación del punto final: Se puede localizar de diferentes maneras el punto final de la valoración de Karl Fischer.

- La *indicación visual* ocurre con un cambio de color de amarillo a marrón-rojizo (característico del primer exceso de reactivo luego del punto final).

- *Indicación electrónica* del punto final, para ello se emplean dos electrodos de platino, a los cuales se aplica un potencial hasta que un galvanómetro registra cero con los electrodos inmersos en la solución. Cuando se alcanza el punto final, el primer pequeño exceso de yodo en la solución produce un largo flujo de corriente, con lo que resulta una deflexión de las agujas del galvanómetro. Esta forma de valoración se llama “ dead-stop ” porque se valora la solución hasta que cambia la aguja del galvanómetro, no se toman medidas precisas.

- La *indicación fotométrica* habitualmente se mide la absorbancia a 525 - 600 nm. Se traza una representación de la absorbancia en función del volumen de valorante.

Antes del punto final la absorbancia permanece próxima a cero, luego del punto final se incrementa linealmente con el volumen. La Intersección de las dos líneas señala el punto final. La valoración fotométrica suministra mayor sensibilidad y precisión que la lograda con la detección visual del punto final.

Interferencias:

Gran parte de los compuestos orgánicos no interfieren. Puede valorarse el agua en presencia de ácidos, alcoholes, fenoles, éteres, hidrocarburos, anhídridos, aminas, amidas y muchas otras sustancias.

Aquellas sustancias que consumen yodo perturban cuantitativamente, un análisis por separado permitirá aplicar una corrección.

Los compuestos cabonílicos interfieren por formación de acetales y cetales con el metanol, liberando agua en el proceso.

Los ácidos carboxílicos son capaces de esterificar con metanol, esta reacción de condensación produce agua. El uso de piridina y dioxano como medio de valoración limita las reacciones de esterificación.

Determinación de agua por destilación azeotrópica

Este método se basa en la destilación por arrastre con vapor de tolueno, del agua contenida en la muestra de un producto bajo condiciones establecidas. Los componentes de la mezcla azeotrópica son inmiscibles, el destilado condensado se separa en dos capas.

Este método es claramente aplicable si la muestra no contiene otras sustancias volátiles susceptibles de afectar al volumen aparente de agua en el colector.

El método de destilación con tolueno es adecuado para drogas crudas, muchos ungüentos y otras mezclas complejas que no se pueden analizar por la valoración de Karl Fischer.

Determinación de agua por secado en estufa

Quizás el método más sencillo para determinar el agua contenida en un sólido sea el secado en estufa, a presión atmosférica, a 100-150°C, hasta que se alcanza peso constante. La pérdida de peso de la muestra se atribuye a la pérdida de agua. Para que este método sea válido, no debe haber sustancias

volátiles distintas del agua en la muestra, y ésta ser estable en las condiciones de tratamiento del secado.

Se determina tanto el agua libre como enlazada. Es necesario buscar para cada compuesto la temperatura apropiada y el período requerido de secado para desalojar toda el agua. Algunos compuestos hidratados son muy resistentes a la completa expulsión del agua por secado a la estufa.

Si la muestra es lábil al calor, también cabe someterla al secado a la estufa, pero a presión reducida. Esto, naturalmente, tiene el efecto de disminuir el punto de ebullición del agua, por lo que se utilizará una temperatura más baja en el proceso.

Si el secado a la presión reducida a temperatura ambiente es suficiente para la separación completa del agua, un desecador con vacío es el aparato más sencillo para eliminar el agua de este tipo de muestras. Se coloca un desecante en la parte inferior del desecador para absorber la humedad. Entre los mejores desecantes se encuentran:

- Perclorato de magnesio (Dehydrita)
- Sulfato de calcio anhidro (drierita)
- Deutóxido de fósforo

Se ha de interponer un desecante (ej: acetona helada) entre el desecador y la bomba para evitar el paso de agua dentro de la bomba o los vapores químicos de la bomba de aceite dentro del desecador.

El proceso de secado con presión reducida cabe describirlo como una aproximación al equilibrio, el cual se alcanza cuando la presión parcial del agua es la misma en todo el sistema. Así en la etapa inicial de un secado por desecación, la presión parcial del vapor de agua de la muestra es bastante mayor que sobre el desecante. Por lo cual dejar enfriar una muestra desecada en la estufa al prepararla para secarla es una fuente potencial de error. Si la muestra está más seca que el desecante, el agua pasará del desecante a la muestra; por esto se debe emplear un agente desecante eficaz.

Técnica.

Homogeneizar y pesar exactamente la muestra y, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, llevar a cabo la determinación sobre 1 o 2 g de muestra. Pesar un pesa-filtro seco y colocar la muestra en el mismo. Distribuir la muestra lo más uniformemente posible. Tapar y colocar el pesa-filtro en la cámara de secado. Secar la muestra a la temperatura y durante el tiempo especificado en la monografía correspondiente.

Nota: la temperatura especificada en la monografía se considera dentro del intervalo de ± 2°c del valor establecido.

Abrir la cámara de secado tapar el pesa-filtro y llevarlo a temperatura ambiente en un desecador antes de pesar.

Para muestras contenidas en cápsulas, emplear el contenido de no menos de cuatro unidades finamente pulverizadas.

Si la monografía correspondiente establece:

- Pérdida por secado mediante análisis termo gravimétrico, emplear una termo balanza.

- Secado al vacío sobre un desecante o secado en un desecador, emplear un desecador de vacío, una pistola de secado al vacío u otro aparato apropiado de secado al vacío, teniendo las precauciones necesarias para asegurar que el desecante se mantenga activo reemplazándolo frecuentemente.

- Secado en un pesa-filtro con tapa provista de un capilar, emplear un pesa filtro y un tubo equipado con una tapa provista de un capilar de un diámetro de 225 ± 25 µm y mantener la cámara de calentamiento a una presión de 5 mmHg o menor. El pesa-filtro debe permanecer tapado durante toda la determinación. Al finalizar el período de calentamiento, llenar la cámara de calentamiento con aire seco, retirar el pesa-filtro y con la tapa colocada dejarlo enfriar en un desecador antes de pesar.

Determinación práctica de agua en una materia prima

La forma de expresar el título de una materia prima para determinar si cumple con las especificaciones de la Farmacopea es:

Sobre Droga Anhidra: SDA
Sobre Droga Desecada: SDD

Cuando un título está especificado como SDA nos indica que el contenido de agua fue determinado por el método de Karl Fischer ya que por él determino solamente el agua, ya sea libre o ligada.
Cuando el título está especificado como SDD nos indica que el método empleado fue pérdida por secado, el mismo no solo determina agua si no también sustancias volátiles a 105ºC. Cuando vamos a elaborar un medicamento es importante conocer el título sobre droga tal cual (SDTC) esto evitará dudas al momento de pesar.

Cómo se relacionan estas expresiones de títulos de la materia prima? Lo veremos con dos ejemplos:

Ejemplo 1

Se realizó la valoración de la siguiente materia prima $C_6H_8ClN_7OHCl.2H_2$ (P.M.: 302,2), aplicando una volumetría ácido base en medio no acuoso.

Determinación del contenido de agua de la materia prima (impureza)
Se disuelven tres alícuotas de la materia prima (mp) en 10 ml de metanol y se valora el contenido de agua con reactivo de Karl Fischer (RKF) de título 13,9 mg/ml. Se realiza un ensayo en blanco con 50 ml de metanol y se obtiene un consumo de 0,45 ml de RKF.

Peso mp (g)	Volumen de RKF (ml)	Vol.RKF-Vol blanco	Cantidad de Agua encontrada (mg)	% de Agua
O,503	4,51	4,42	61,44	12,21
0,509	4,55	4,46	61,99	12,18
0,500	4,49	4,4	61,16	12,23

Valor medio	12,21
C.V .%	0,21

El volumen del blanco que debe restarse al volumen de reactivo gastado en cada alícuota se calcula de la siguiente manera:

50 ml de metanol (consumieron) → 0,45 ml de RKF
10 ml de metanol (utilizado para la disolución de cada alícuota) → X= 0,09 ml de RKF

Con los ml de RKF corregido y el título de RKF determinamos los mg de H_2O encontrados en cada alícuota y luego lo expreso como % de H_2O.

0,503 g de muestra → 0,06144 g de H_2O
100 g de muestra → x = 12,21 g de H_2O =12,21% de H_2O

Nota: Para expresar el resultado debo calcular el valor medio de mis tres determinaciones y una medida de la desviación de los datos obtenidos respecto del valor medio. (C.V %)

Valoración de la materia prima.

Procedimiento: Se disuelve cada una de las alícuotas en 100 ml de ácido acético glacial, se agrega 10 ml de acetato de mercurio y se mezcla. Se adicionan 4 gotas del indicador y se titula con ácido perclórico 0,1021N ($HClO_4$).
1 ml de ácido perclórico 0,1N es equivalente a 26,61 mg de $C_6H_8ClN_7OHCl$

Peso mp (g)	Vol. $HClO_4$ (ml)	Vol. $HClO_4$ - Vol. blanco (ml)	g de mp encontrados	% sdtc
0,422	13,7	13,5	0,367	86,91
0,374	12,2	12	0,326	87,17
0,381	12,3	12,1	0,329	86,35
0,392	12,8	12,6	0,342	87,24
----	0,2			

Valor medio	86,92 %
C.V.%	0,46

% sdtc = V. N. P meq . 100 / P mtra.

V = Es el volumen corregido de $HClO_4$ en ml gastado con cada alícuota.

N = La normalidad del reactivo titulante 0,1021

Pmeq = Peso mili equivalente de $C_6H_8ClN_7OHCl$

Pmtra = Peso de cada alícuota

Nuestra materia prima tiene un título de 86,92 % sdtc y 12,21 % de H2O. Si queremos saber si cumple con las exigencias de la monografía (98,0 – 100,0 % de $C_6H_8ClN_7OHCl$ expresado SDA), debemos expresar el título SDA.

En esta materia prima 12,21 % corresponde a agua y el 87,79% (100-12,21) es p.a. $C_6H_8ClN_7OHCl$ más impurezas (polvo anhidro). Pero como el polvo anhidro tiene una pureza de 86,92%, entonces lo que tengo de $C_6H_8ClN_7OHCl$ expresado SDA es 99,0 %

87,79g de polvo anhidro → 86,92g de $C_6H_8ClN_7OHCl$

100g de polvo anhidro → x = 99,0 % (de $C_6H_8ClN_7OHCl$) SDA

Una forma aproximada de determinarlo sería:

% de H_2O + Titulo %SDTC = % SDA

12,21% + 86,92% = 99,13% SDA

Ejemplo 2

Se debe preparar 100 cápsulas conteniendo metoclopramida clorhidrato 10 mg

1 caps --------- 10 mg metoclopramida clorhidrato

100 caps ---------X= 1000 mg metoclopramida clorhidrato

En protocolo analítico de metoclopramida clorhidrato MP se informa:

Título 99,0 % SDA

% de agua: 5,13%

En este caso me interesa conocer el título SDTC:

100 g MP anhidro ………. 99,0 g metoclopramida clorhidrato

94,87 g MP anhidro …….. X= 93,92 g metoclopramida clorhidrato

93,92 % es ahora el título de metoclopramida clorhidrato *SDTC*

Necesito 1000 mg de metoclopramida clorhidrato.

93,92 mg metoclopramida clorhidrato ……… 100 mg polvo

1000 mg metoclopramida clorhidrato ………. X= 1064,73 mg MP

Se deberá pesar 1064,73 mg de MP para obtener 1000 de metoclopramida clorhidrato.

Preguntas Orientadoras

1. Que entiende por agua libre y agua enlazada?
2. Como está formado el reactivo de Karl Fischer?
3. Que métodos de determinación de agua conoce? Explique detalladamente
4. Se disolvieron 0,5404 g de agua en 50 ml de metanol. Se añadieron 5 ml de esta solución a 20 ml de metanol y valoraron con RKF, consumiéndose 9,5 ml. Asimismo 25 ml del mismo metanol requirieron 0,8 ml de reactivo. Calcúlese el título del reactivo de KF
5. Se disolvieron 0,2310 g de una muestra en 10 ml de metanol y se valoró con el RKF del problema anterior .Se requirieron 2,4 ml de reactivo para valorar el agua de la muestra. Cuál es el porcentaje de agua que contenía la muestra?

Test de Autoevaluación

1. El reactivo de KF se estandariza con:
    (a) Cantidades conocidas de alcohol

(b) Cantidades conocidas de agua

(c) Cantidades conocidas de tartrato de sodio

2. El punto final de la valoración con KF se puede detectar mediante:
   (a) Cambio de color amarillo a marrón rojizo
   (b) Por absorción a 425 nm
   (c) Por absorción a 525-600 nm midiendo absorbancia versus volumen de valorante

3. Las sustancias que interfieren en la valoración de KF son:
   (a) Ácidos y fenoles
   (b) Sustancias que consumen iodo cuantitativamente
   (c) Grupos carbonilos por formación de acetales

4. La determinación de agua por secado en estufa a 105°C se utiliza para:
   (a) Sustancias lábiles a la temperatura
   (b) Sustancias volátiles distintas al agua
   (c) Para determinar tanto agua libre como enlazada

Bibliografía

1. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VII ed. (2003) Buenos Aires.
2. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 35) (2011) Rockville.
3. K.A.Connors (1980). *Curso de Análisis Farmacéutico*. 2da. Ed. 1980.
4. Pradeau D. (1998) *Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos*. Uteha Noriega Editores.

CAPITULO 9

ANÁLISIS FUNCIONAL

Patricia Retaco

Introducción

Se llama Grupo Funcional al átomo o conjunto de átomos que presentan una estructura y propiedades físico-químicas determinadas que caracterizan a los compuestos orgánicos que los contienen.

Un alto porcentaje de principios activos presentes en medicamentos son moléculas orgánicas formadas por una estructura C e H y de la sustitución de estos átomos se obtienen los grupos funcionales o funciones químicas, y son estos grupos funcionales quienes determinan las propiedades químicas y farmacológicas en los fármacos.

Una vez reconocidos los grupos funcionales presentes en una molécula orgánica y conociendo las reacciones químicas que ellos experimentan posteriormente se podrá seleccionar el grupo funcional presente más adecuado para realizar un análisis cuantitativo. Los Métodos de Análisis son prácticos para comprobar la identidad de un medicamento. Ciertos compuestos orgánicos son suficientemente ácidos o básicos por lo cual y bajo ciertas condiciones, se pueden determinar por valoración directa con un titulante, valorante o solución estandarizada.

A continuación se describirán algunos métodos de análisis para grupos funcionales presentes en ingredientes activos farmacológicamente.

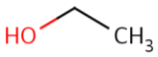
➲ Compuestos hidroxílicos

El comportamiento químico del grupo hidroxilo está marcadamente afectado por la estructura del resto de la molécula.

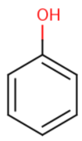
Considerando su reactividad pueden dividirse en cuatro grandes grupos: alcoholes, glicoles, enoles y fenoles.

Los alcoholes contienen un grupo OH enlazado a un átomo de C, y se pueden clasificar en Alcoholes primarios, secundarios y terciarios. Los glicoles poseen más de un grupo OH adyacentes. Los enoles son compuestos en lo que uno de los átomos de hidrógeno unido a un carbono de un doble enlace es remplazado por un grupo hidroxilo.

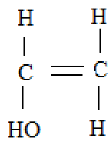
Los Fenoles contienen un grupo OH enlazado a un átomo de C en un anillo aromático. Si bien los fenoles pueden parecerse a un alcohol, el anillo bencénico altera las propiedades del grupo Hidroxilo.



Etanol



Fenol



Enol

Algunos fármacos en donde el grupo hidroxilo es esencial para la actividad: haloperidol, morfina y esteroides (17 α-Etinilestradiol) entre otros.

Métodos de Análisis

1. Acilación con anhídrido acético

Fundamento

Los métodos de acilación se utilizan para *alcoholes primarios y secundarios,* en presencia del reactivo acilante y bajo ciertas condiciones forman ésteres. La reacción implica la sustitución del hidrógeno del hidroxilo por un grupo acilo.

$$R\text{-}OH + (R'CO)_2O \quad \leftrightarrow \quad R'COOR + R'COOH$$

Para incrementar la velocidad de la reacción, se adicionan catalizadores a la mezcla de reacción. Se pueden utilizar:

- Catalizadores nucleofílicos como la piridina que acelera la velocidad de reacción con respecto a otros solventes. Se produce la formación de un intermediario, el ion acil- piridinio (agente acilante).
- Catálisis ácida: con ácido perclórico y como solvente piridina.
- Adicionando ácido perclórico y con acetato de etilo. Este sistema está sujeto a numerosas interferencias a causa de la alta reactividad del acetato de etilo.

El mecanismo supone la formación del ion acetilio:

$$(Ac)_2 + HClO_4 \leftrightarrow (Ac)_2\ OH^+ + ClO_4^-$$

$$(Ac)_2\ OH^+ \leftrightarrow HOAc + CH_3CO^+ \quad \text{ion acetilio}$$

$$CH_3CO^+ + R\text{-}OH \leftrightarrow AcOR + H^+$$

Técnica

Se trasvasa la muestra pesada con exactitud a un erlenmeyer seco con tapón de vidrio esmerilado, se adiciona un exceso de reactivo anhídrido acético. Se agita la mezcla para disolver la muestra. Se deja en reposo un cierto tiempo y a una determinada temperatura para que se lleve a cabo la acilación. Completada la reacción se hidroliza el exceso de anhídrido y se valora el ácido formado con un álcali estándar (hidróxido de sodio 0.5N, libre de carbonato), usando como indicador fenolftaleína 1% en piridina. Deberá hacerse un ensayo en blanco.

Nota: Para que la reacción sea completa el consumo de la muestra debe representar aproximadamente el 60% del consumo del blanco.

Interferencias

- Los compuestos hidroxílicos requieren elevadas temperaturas para que la reacción sea cuantitativa y si existe impedimento estérico, la reacción es muy lenta.
- Los compuestos hidroxílicos aromáticos que reaccionan incompletamente, (en estos casos es posible la determinación utilizando como catalizador ácido perclórico en acetato de etilo).

- Muchas aminas primarias y secundarias reaccionan cuantitativamente con el reactivo por un mecanismo idéntico al ya descrito y más rápidamente que los compuestos hidroxílicos originando la formación de una amida. Las aminas terciarias al no poseer un hidrogeno reemplazable no experimentan esta reacción.
- Los aldehídos de bajo peso molecular que por condensación aldólica formen una función hidroxilo acilable.

2. Para 1,2 glicoles con ácido periódico

Fundamento

Se produce la oxidación del compuesto 1,2 dihidroxílico por el ácido periódico obteniéndose dos aldehídos.

OH OH
| |
R-CH-CH-R´ + HIO_4 → RCHO + R´CHO + H_2O + HIO_3

Posteriormente se añade un volumen de una solución de ioduro de potasio y se valora con solución de tiosulfato de sodio.

Valoración del blanco

El ácido periódico oxida el ioduro a iodo. El ácido iódico producido es capaz de oxidar al ioduro.

$$2\,H^+ + HIO_4 + 2I^- \rightarrow HIO_3 + I_2 + H_2O$$
$$5\,H^+ + HIO_3 + 5I^- \rightarrow 3\,I_2 + 3H_2O$$

Cada mol de ácido periódico produce 4 moles de iodo (8 equivalentes)

Considérese ahora la valoración de la muestra. Completada la oxidación del glicol, la solución contiene exceso de ácido periódico más un mol de ácido iódico por cada unidad 1,2 dihidroxílica que se oxidó. Así cada periódico produce 4 iodos y cada iódico, 3 iodos, con el resultado total de que por cada unidad 1,2 dihidroxílica en la muestra resulta la producción de 1 mol (2 equivalentes) menos de iodo relativo a la valoración del blanco. Es decir 1 mol de unidad 1,2 dihidroxílica corresponde a una disminución de 2 equivalentes en el consumo de tiosulfato; por tanto, el peso equivalente de una unidad 1,2

dihidroxílica sencilla es igual a la mitad de su peso molecular, según la reacción final de valoración.

Se ha observado que si un compuesto posee *n* grupos hidroxílicos adyacentes se consumirán en la oxidación *(n-1)* moles de ácido periódico. Así, de hecho, se oxidan *(n-1)* unidades dihidroxílicas y el Peso Equivalente (PE) de la muestra es igual a *½(n-1)* veces su peso molecular.

Para el etilenglicol, por ejemplo, *n=2* y peso equivalente (PE) =PM/2.

De acuerdo con el razonamiento anterior, si la muestra, el glicol, consume todo su ácido periódico, el volumen empleado en la valoración de la muestra será un 75% que el invertido en la valoración del blanco. Si el volumen empleado en la valoración de la muestra es menor que, aproximadamente el 80% del volumen del blanco, es aconsejable repetir el análisis con una muestra más pequeña de glicol, para asegurarse de que hay exceso de ácido periódico.

Técnica

Se adiciona a la muestra, previamente disuelta, un exceso de ácido periódico (este reactivo debe protegerse de la luz). Completada la oxidación, se añade ioduro de potasio y se valora el iodo liberado con tiosulfato. La diferencia entre el tiosulfato consumido por el blanco y la muestra guarda relación con la cantidad de ácido periódico utilizado en la oxidación del glicol. Se debe hacer un ensayo en blanco.

Interferencias

Los aminoalcoholes e hidroxicetonas son posibles interferencias.

3. Bromación de Fenoles

Fundamento

Compuestos hidroxílicos aromáticos reaccionan con bromo vía sustitución en posición o*rto* y *para* respecto del grupo hidroxilo.

Técnica

Se adiciona a la muestra, previamente disuelta, un exceso de reactivo de bromo (en ácido acético). Completada la reacción, se añade ioduro de potasio y se valora el iodo liberado con tiosulfato. Se debe hacer un ensayo en blanco. La diferencia entre el tiosulfato consumido por el blanco y la muestra guarda relación con la cantidad de bromo utilizado para sustituir el compuesto hidroxílico.

Interferencias

- Aminas aromáticas capaces de dar reacciones de sustitución.
- Aldehídos y olefinas que pueden consumir reactivo y sufrir oxidaciones y adiciones respectivamente.

Métodos de Análisis Alternativos

A. Método colorimétrico con ion férrico

Fundamento

Los fenoles reaccionan con una solución de nitrato de hierro (III) en ácido nítrico, se produce un color característico cuya intensidad se mide en la región del visible a una determinada longitud de onda.

B. Método colorimétrico con las sales de diazonio

Fundamento

Los fenoles se acoplan en posición *para* respecto al grupo fenólico (si esta posición está ocupada el acoplamiento se desarrollará en la posición *orto*) con una sal de diazonio, para dar un compuesto coloreado característico cuya intensidad se mide en la región del visible a una determinada longitud de onda.

C. Método colorimétrico con ácido cromotrópico para 1,2 glicoles

Fundamento

Los compuestos que poseen 1,2 glicoles y que por oxidación con ácido periódico generan como producto de reacción *formaldehído*, éste reacciona con ácido cromotrópico (1,8 dihidroxinaftaleno-3,5-disulfónico) desarrollando una coloración característica cuya intensidad se mide en la región del visible a una determinada longitud de onda.

D. Volumetría ácido-base

Fundamento

Los fenoles se comportan como ácidos débiles ya que ocurre la estabilización resonante del anión por deslocalización de la carga negativa. Es posible valorarlos con exactitud en sistemas no acuosos. Los disolventes recomendados para valorar ácidos débiles tienen carácter básico, pueden ser neutros también para la valoración diferenciadora de mezclas (ver tabla 1). Valorantes adecuados son por ejemplo:

- Metóxidos de sodio, potasio y litio en soluciones de metanol-benceno
- Hidróxido de tetrabutilamonio.

Todos los valorantes básicos han de almacenarse en recipientes pyrex o de polietileno y con mínima exposición al $C0_2$ atmosférico.

Para estandarizar la solución de valorante se suele usar ácido benzoico, las valoraciones se efectúan en corriente de nitrógeno o en el punto de ebullición para minimizar la absorción de C02.

Aplicaciones

Los ácidos cuyos valores de pKa ≤ 7 (entre 3-6) se valoran con detección visual del punto final mediante azul de timol, en dimetilformamida. Los ácidos con pKa entre 7-11 requieren detección potenciométrica del punto final.

Los alcoholes son ácidos muy débiles y muy pocos se pueden valorar como ácidos. Con los fenoles la situación es diferente, a pesar de ser ácidos débiles

se pueden valorar en medios no acuosos. Los tioles son ácidos mucho más fuertes que sus análogos oxigenados.

➲ Aminas

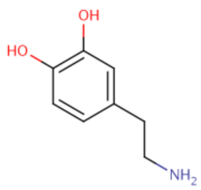
Las aminas se clasifican en:

Aminas Primarias	R-NH_2
Aminas Secundarias	R-N-HR_1
Aminas Terciarias	R-N-R_1R_2(R_3N)

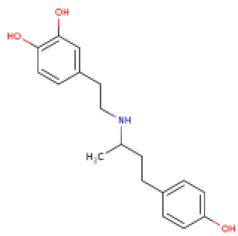
R: Radicales alifáticos y/o aromáticos.

Las alquilaminas son más básicas que el NH_3 ya que los grupos alquilo son donantes de electrones al N en cambio los grupos que atraen electrones disminuyen la basicidad, por lo cual las aminas aromáticas son bases más débiles que las alifáticas.

Ejemplos de aminas presentes en principios activos:

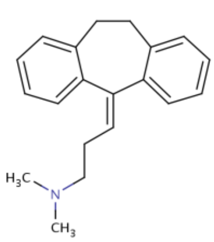


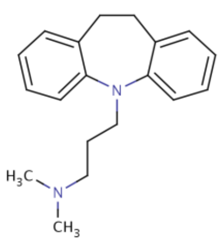
Dopamina

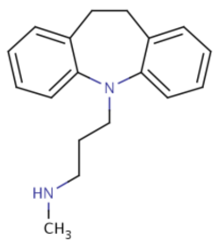


Dobutamina

Los antidepresivos tricíclicos a menudo se clasifican como aminas terciarias (amitriptilina, imipramina) y secundarias (desipramina)







Métodos de Análisis

1. Formación de iminas (Bases de Schiff) usando como reactivo 2,4 pentanodiona

Fundamento

Las aminas primarias alifáticas experimentan condensación con carbonilos para producir iminas.

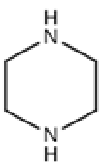
$$RNH_2 + R'CHO \leftrightarrow R'HC = NR + H_2O$$

Técnica

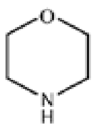
Se adiciona a la muestra, previamente disuelta en piridina, un exceso de reactivo 2,4-pentanodiona, completada la formación de iminas, se adiciona un indicador (timolftaleína) y el exceso del compuesto carbonílico, se valora por retroceso con solución estándar de álcali como por ejemplo metóxido de sodio. Se debe hacer un ensayo en blanco.

Interferencias

- Los ácidos libres reaccionan lentamente con el reactivo valorante.
- Puede ser aplicado a aminoácidos, pero previamente deben ser transformados en su sal sódica.
- También se puede aplicar para determinar amino-alcoholes, etilenaminas y compuestos amino primario que tengan un nitrógeno heterocíclico. Dicha clase de compuestos, es dificultoso determinarlos por otros métodos.
- Las aminas aromáticas primarias no pueden ser determinadas por este método.
- Alcoholaminas secundarias, como dietanolamina y tioles reaccionan bajo las condiciones del método.
- Aminas secundarias heterocíclicas, como piperazina y morfolina, reaccionan lentamente con 2,4-pentanodiona. Dicha interferencia puede ser corregida conduciendo la reacción a 0°C.



Piperazina



Morfolina

2. Volumetría ácido-base para aminas

Fundamento

Esta técnica tiene amplio uso en análisis farmacéutico, muchas de estas valoraciones figuran en la Farmacopea Argentina, en la USP y en otras farmacopeas. La posibilidad de utilizar la volumetría ácido-base depende de la concentración de la base y de su fuerza.

Las aminas alifáticas son suficientemente básicas para poder ser valoradas en soluciones acuosas con un ácido fuerte, mientras que las aminas aromáticas son demasiado débiles para valorarlas en medio acuoso.

Aplicaciones

Las bases cuyos valores de Kb sean iguales o mayores que 10^{-6} podrán ser valoradas en medios acuosos (pKb ≤ 6 y pKa ≥8), en cambio las bases con valores de Kb menor que 10^{-6} (pKb > 6 y pKa <8) no podrán ser valoradas en medios acuosos y requerirán de medios no acuosos. Además las bases cuyos valores de $pKa_{(en\ agua)}$ > 4 (pKb < 10) están niveladas en ácido acético glacial y se pueden valorar por detección visual del punto final, en cambio las bases cuyos valores de $pKa_{(en\ agua)}$ se hallan en el margen 1-4 (pKb> 10) cabe analizarlas mediante detección potenciométrica del punto final. Muchas aminas heterocíclicas y aminas aromáticas sustituidas pertenecen a esta clase.

El ácido acético glacial es el disolvente más usado en la valoración de bases, el anhídrido acético se utiliza para el análisis de bases muy débiles, tales como las amidas.

Algunas veces se analizan mezclas de bases de distintas fuerzas seleccionando un disolvente diferenciador para las bases, como pueden ser acetonitrilo o nitrometano y se detecta el punto final por potenciometría.

Las sales halogenadas de aminas no pueden determinarse directamente ya que no son sustancias intrínsecamente básicas por la relativamente alta acidez del hidrógeno del haluro, éste puede ser reemplazado por acetato por adición de un exceso de solución de acetato de mercurio, por conversión a un derivado básico, el acetato de la amina.

El acetato de mercurio que no reaccionó no interfiere ya que en medio de ácido acético glacial tiene una basicidad despreciable, debido a que los haluros de mercurio en solventes orgánicos con baja polaridad están prácticamente no disociados y no forman parte en el equilibrio.

$$2RNH_2.HX \leftrightarrows RNH^{+3} + 2X^-$$
$$2X^- + AC_2Hg \leftrightarrows X_2Hg + 2\,Ac^-$$
$$2Cl0_4H + 2AcOH \rightarrow 2AcOH_2^+ + 2Cl0_4^-$$
$$2AcOH_2^+ + 2Ac^- \longrightarrow 4AcOH$$

Donde X= Cl, Br, I, F.

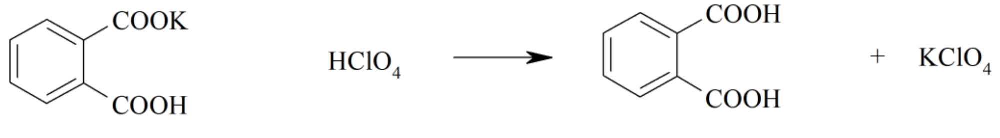
Los acetatos de aminas son valorados en forma usual. Con el agregado del acetato de mercurio a la solución del haluro se produce el reemplazo de las bases por una cantidad equivalente de ion acetato que se comporta como la base más fuerte que puede existir en medio acético.

Los disolventes que se usan como medios en la valoración de bases débiles son neutros o ácidos (ver Tabla 1).

Como valorante se utiliza un ácido fuerte. Por ejemplo:

- Ácido perclórico: como el disolvente, ácido acético, es diferenciador para los ácidos minerales, el perclórico es el más fuerte y aconsejable. Este ácido disuelto en ácido acético es el valorante más usado para determinar bases débiles. Se disponen comercialmente de ácido perclórico en solución acuosa concentrada, por lo que conviene separar el agua, con este propósito se suele adicionar cierta cantidad (estimada de antemano) de anhídrido acético, se evita adicionar exceso de anhídrido por que las muestras acilables, tales como las aminas primarias y secundarias, podrían convertirse en su presencia en compuestos mucho menos básicos (amidas).

La estandarización de valorantes ácidos es factible con cualquier sustancia que sea una base fuerte y de gran pureza, por ejemplo: biftalato de potasio:



El análisis volumétrico en soluciones no acuosas presenta el inconveniente del alto valor del coeficiente de expansión cúbica de la mayoría de los líquidos orgánicos, es decir que con los cambios de temperatura la normalidad de las soluciones puede variar.

La detección del punto final se efectúa por lo general con indicadores o de modo potenciométrico. Los indicadores que se utilizan para las valoraciones de bases son bases muy débiles (ver tabla 1). Para la valoración de bases se utiliza el cristal violeta (violeta de genciana), también el violeta de metilo se comporta de manera similar. El cambio de color es complejo pasa del violeta (color básico) al azul-verdoso, verde esmeralda, amarillo (color ácido).

El colorante α-naftolbenceína es adecuado para valoraciones en ácido acético glacial, el cambio de color es de amarillo (color básico) al verde (color ácido). Otro buen indicador es el rojo de quinaldina siendo el cambio de color de rosa (color básico) a incoloro (color ácido).

3. Nitrito volumetría para aminas primarias aromáticas

Fundamento

Este método es llamado también de Diazotación, pues el fundamento del mismo consiste en la reacción entre el ácido nitroso y el grupo amino primario aromático, para dar una sal de diazonio. La reacción global entre el ácido nitroso y las aminas aromáticas es:

$$R\text{-}NH_2 \quad + \quad NO_2H \quad + \quad HCl \quad \rightarrow \quad (R\text{-}N_2)^+ \, Cl^- \quad + \quad 2H_2O$$

Es probable que la reacción se desarrolle por medio de una nitrosación inicial de la amina seguida de la tautomerización de la nitrosamina y de la descomposición del diazohidróxido:

$$R\text{-}NH_2 \quad + \quad NO_2H \quad \rightarrow \quad R\text{-}NH\text{-}N{=}O \quad + \quad H_2O$$

nitrosamina

$$R\text{-}NH\text{-}N{=}O \quad \leftrightarrows \quad R\text{-}N{=}N\text{-}HO$$

diazohidróxido

$$\text{R-N=N-HO} \quad + \quad \text{HCl} \quad \rightarrow \quad (\text{R-N}\equiv\text{N})^{+}\ \text{Cl}^{-} \quad + \quad H_2O$$

Sal de diazonio

Debido a la inestabilidad del ácido nitroso se lo reemplaza por nitrito de sodio en medio ácido.

Este método se puede aplicar a anestésicos locales con función amina libre y para sulfas.

Técnica

La muestra de la amina a valorar se disuelve en agua destilada y se le agrega una determinada cantidad de HCl concentrado (puede usarse como catalizador de la reacción de nitrosación BrK al 25% si la amina no reacciona rápidamente). Se sumerge el recipiente conteniendo la solución en un baño de hielo–agua (≈ 5°C) para minimizar la pérdida del ácido nitroso. Luego se sumerge la punta de la bureta conteniendo el valorante (Solución de nitrito de sodio) en la solución a valorar, se adiciona el valorante desde bureta lentamente y con agitación continua, tratando de evitar una alta concentración de NO_2H.

Se determina el punto final empleando electrodos apropiados (platino-calomel o platino-platino) o mediante un indicador externo, como puede ser un papel de filtro impregnado con engrudo de almidón y solución de ioduro de potasio o una piedra de toque con dicha solución. Luego del punto final una gota de la solución de valoración produce inmediatamente un color azul, estable durante un minuto (*no confundir un lento y progresivo color azul que es causa de la oxidación en el aire del ioduro en medio ácido).* El valorante se estandariza con ácido sulfanílico como patrón primario.

Interferencias

- Interfieren las aminas secundarias que consumen NO_2H, por formación de los derivados *N-nitrosados*, y las aminas alifáticas que también consumen NO_2H con liberación de nitrógeno y producción de un alcohol.
- Las aminas terciarias alifáticas en su reacción con NO_2H producen nitrógeno.

- Las aminas terciarias aromáticas forman compuestos *C-nitroso aromáticos*.

Métodos de Análisis Alternativos

A. Método colorimétrico de diazotación y copulación para aminas primarias aromáticas

Fundamento

En primera instancia se produce diazotación de la amina aromática primaria seguido del acoplamiento de la sal de diazonio, altamente reactiva, con un segundo compuesto orgánico para dar un compuesto azo coloreado. El fenol es el reactivo copulante característico.

El producto de reacción es altamente conjugado y absorbe radiación de longitudes de onda en la zona del visible, del cual se puede medir espectrofotométricamente su concentración.

Otro reactivo de acoplamiento es la N-(1-naftil) etilendiamina (Reactivo de Bratton-Marshall).

B. Método colorimétrico para aminas primarias alifáticas con salicilaldehido

Fundamento

Las aminas alifáticas primarias reaccionan con salicilaldehído como reactivo para generar una salicilimina que forma un complejo imino-cúprico, con una sal de cobre que se extrae en n-hexanol. Se determina colorimétricamente el cobre por reacción con ácido N,N-di (hidroxietil) ditiocarbámico, dando un complejo de cobre ditiocarbamato determinándose su absorbancia a 420 nm.

Volumetría en Fase Heterogénea

Fundamento

La valoración en dos fases de aminas terciarias y sales de amonio cuaternarias con tensioactivos aniónicos, tales como laurilsulfato de sodio o dioctilsulfosuccinato de sodio es un método analítico de interés farmacéutico.
El proceso esencial en esta valoración de un ion amonio orgánico (Q^+) o de una amina (Q) con laurilsulfato de sodio (X^-) es una extracción de par iónico:

$$Q^+_{aq.} + X^-_{aq.} \leftrightarrows QX_{org}$$
$$Q_{org} + X^-_{aq} \leftrightarrows QX_{org}$$

La magnitud de la extracción depende de la estructura del par iónico y sus componentes así como las propiedades de la fase orgánica. Todos los pares iónicos tienen más o menos carácter polar y solventes no polares tales como cloroformo y diclorometano son agentes extractivos muy usados pero compuestos hidrofílicos pueden requerir solventes más protofílicos, por ejemplo alcoholes lipofílicos.
El punto final puede ser indicado por el uso de un colorante que forme par iónico con el valorante en la fase orgánica:

$$\text{colorante}_{org} + \text{LSNa}_{aq} \leftrightarrows \text{colorante.LSNa}_{org}$$

También puede usarse un indicador que forme par iónico con la sal de amonio o la amina valorada:

$$\left.\begin{matrix} Q^+_{aq} \\ Q_{org} \end{matrix}\right\} + \text{colorante}_{org} \leftrightarrows \text{Q colorante}_{org}$$

El primer caso sería el de un *colorante básico*; el laurilsulfato de sodio se combina con la base orgánica dando un compuesto soluble en fase orgánica; ante el primer exceso del tensioactivo éste se compleja con el colorante dando un compuesto insoluble en agua, que se visualiza en el punto final por un cambio de color del indicador que queda complejado en la fase orgánica.

Es conveniente usar en lo posible este tipo de indicadores, ya que la constante de extracción de su par iónico será independiente de las propiedades de la muestra.

En el segundo caso se trata de un *colorante ácido;* al iniciarse la valoración se encuentra complejado con la base en la fase orgánica. Cuando se agrega el tensioactivo; éste desplaza al colorante, que pasa en su forma disociada a la fase acuosa, que se va coloreando paulatinamente, en el punto final se decolora la fase orgánica.

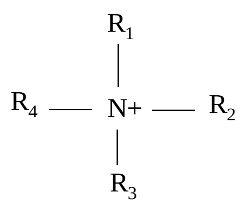
En este tipo de valoraciones es importante la elección de la base orgánica a valorar:

- Su peso molecular debe ser elevado, superior a los 200 g/mol.
- La presencia de grupos hidrofílicos, por ejemplo -OH, disminuye el rendimiento.
- Los grupos metoxi, etoxi y cabonilo pueden ejercer una influencia perturbadora, pero esto debe comprobarse para cada caso en especial, ya que dicho efecto puede anularse ajustando ciertas variables como por ejemplo pH de la reacción, valorante, solvente orgánico, etc. Deberá ponerse a punto el método.

La puesta a punto del método también es necesaria en el caso de sustancias con más de una función nitrogenada.

En general las bases orgánicas que podrían ser valoradas por esta técnica se agrupan de la siguiente manera:

- Amonios cuaternarios alifáticos, del tipo:



R_1, R_2, R_3 y R_4: cadenas alifáticas de número de carbonos elevado

Como por ejemplo: Cetrimonio, Cetavlon, Biocetab.

- Amonios cuaternarios carbocíclicos o heterocíclicos. Como por ejemplo: Cloruro de Benzalconio.

- Aminas terciarias. Como por ejemplo: derivados de la Fenotiazina, Levomepromazina, Clorpromazina.
- Alcaloides del grupo de la morfina y otras bases orgánicas. Como por ejemplo: Narcotina, Reserpina.

Ventajas del método

- Es un método simple y rápido, fácil de realizar.
- Se puede aplicar directamente sobre el producto terminado ya que la mayor parte de los excipientes no interfiere y no hay que eliminarlos.
- Tiene buen límite de detección ya que permite valorar cantidades del orden de los 10 mg de sustancia, a diferencia de otros métodos volumétricos que requieren por lo menos 1mEq de principio activo, por ello es llamado también método semi-microvolumétrico.
- Requiere reactivos e instrumental muy sencillo.
- Permite valorar la base orgánica libre o salificada, con solo disolverla en la fase adecuada.
- El punto final es fácil de detectar, incluso a veces ofrece una doble indicación, coloración de una fase y decoloración de la otra.

Reactivos empleados

- Solventes: agua, cloroformo o benceno.
- Colorantes: pueden ser ácidos: azul de timol, azul de bromofenol, púrpura de bromocresol o básicos: azul de metileno, amarillo de dimetilo.
- Agente tensioactivo: laurilsulfato de sodio, que es una mezcla de alquilsulfatos de sodio constituida principalmente por dodecilsulfato de sodio. La solución de laurilsulfato de sodio se debe estandarizar con papaverina como patrón primario.

Técnica

Disolver la muestra (se disolverá en una u otra fase según esté libre o salificada) en una mezcla de volúmenes iguales de los solventes seleccionados, (por ejemplo, 20:20 cloroformo:agua), se añade 5 ml del

colorante indicador y se titula con el agente tensioactivo, agitando constantemente luego de cada agregado, hasta viraje del indicador.

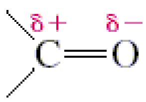
Interferencias

Pueden llegar a interferir los ácidos orgánicos y los fenoles pues suelen formar, sobre todo con los colorantes básicos, una sal entre el anión y el catión colorante.

Muchas aminas y compuestos de amonio cuaternario forman pares iónicos con colorantes ácidos, determinándose la concentración de las mismas por extracción con un solvente determinado y leyendo su absorbancia al visible.

➲ Compuestos carbonílicos

Los aldehídos y cetonas tienen un grupo carbonilo, es decir un átomo de carbono unido a un átomo de oxigeno por medio de un doble enlace, ese enlace se encuentra altamente polarizado debido a la alta electronegatividad del oxígeno, siendo éste nucleofílico, mientras que el carbono porta una carga positiva parcial, siendo un sitio electrofílico y reacciona con los nucleófilos.



Las reacciones generales de los compuestos carbonílicos son:

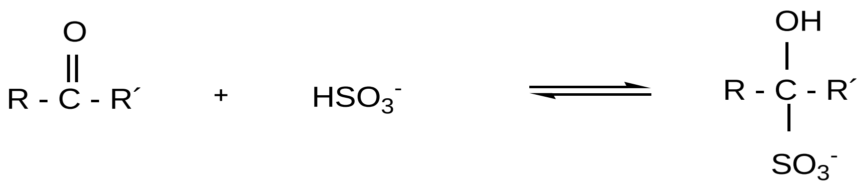
- Adición nucleofílica
- Sustitución nucleofílica
- Condensación del grupo carbonilo
- Sustitución en α

Métodos de Análisis de Aldehídos

1. Adición de bisulfito

Fundamento

El bisulfito se adiciona al doble enlace carbonílico –C=O por un ataque nucleofílico sobre el carbono. Se forma un enlace C – S



Técnica

En este método el bisulfito no se usa directamente como reactivo dada su inestabilidad. Se trabaja con un exceso de sulfito de sodio al que se añade antes de incorporar la muestra, un volumen conocido de ácido sulfúrico que genera el bisulfito "in situ", completada la reacción de adición se valora con álcali, el exceso de bisulfito. Se debe hacer un ensayo en blanco.

Interferencias

- Las metilcetonas y las cetonas alicíclicas y las cetonas voluminosas que adicionan bisulfito con bastante lentitud.
- Ácidos o bases que impurifiquen la muestra.

2. Método de oxidación

Fundamento

Se pueden oxidar los grupos aldehídos a los correspondientes ácidos carboxílicos con agentes oxidantes tales como óxidos de plata (AgO_2) Reactivo de Tollens.

$$R\text{-}CHO + Ag_2O \rightarrow RCOOH + 2Ag$$

Técnica

Se determina por adición de un exceso de Reactivo de Tollens. Se produce la aparición de un espejo de plata o una turbidez. Completada la oxidación, se determina el exceso de plata por valoración con ioduro de potasio.

También puede valorarse el ácido producido con álcali estándar.

Se debe hacer un ensayo en blanco.

3. Formación de hidrazonas con dimetilhidracina

Fundamento

La formación de hidrazona se lleva a cabo por condensación entre el grupo carbonilo y una hidracina.

$$R-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-H \quad + \quad R'-NH-NH_2 \quad \leftrightarrow \quad R-\overset{\overset{\displaystyle N-NH-R'}{\|}}{C}-H \quad + \quad H_2O$$

Técnica

Se adiciona a la muestra un exceso de reactivo, culminada la reacción el exceso de dimetilhidracina se valora por retroceso con un ácido estandarizado, con detección potenciométrica del punto final. Se debe hacer un ensayo en blanco.

Interferencias

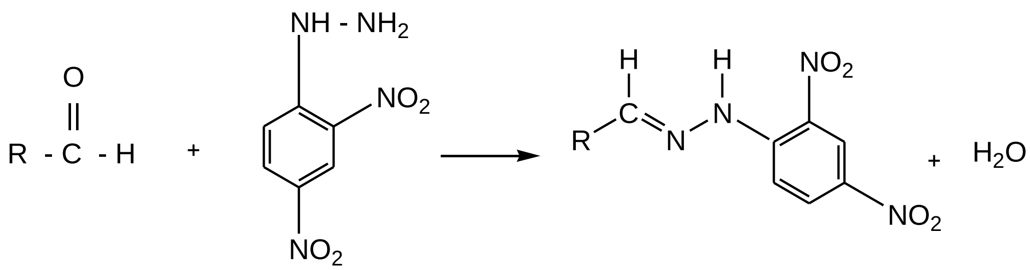
- Los ácidos fuertes.
- Las *cetonas* son bastante básicas y no podrían diferenciarse del exceso de hidracina (básica) y no es posible distinguirlas potenciométricamente del reactivo.

Métodos de Análisis de Aldehídos y Cetonas

1. Formación de hidrazona con 2,4-dinitrofenilhidracina

Fundamento

La formación de hidrazona se lleva a cabo por condensación entre el grupo carbonilo y una hidracina.



Las 2,4-dinitrofenilhidrazonas son derivados insolubles, cristalinos y coloreados. Se aíslan y pesan fácilmente, y el alto peso molecular de la hidrazona permite el análisis de muestras relativamente pequeñas por gravimetría.

Técnica

Se adiciona el reactivo 2,4-dinitrofenilhidracina a la muestra a analizar disuelta en una solución ácida. Transcurrida la condensación se filtra el sólido obtenido a través de un crisol tarado, que posteriormente se seca y pesa.

Interferencia

Acetales y cetales ya que la reacción se lleva a cabo en medio ácido.

2. Método colorimétrico con 2,4-dinitrofenilhidracina

Fundamento

La formación de hidrazona se lleva a cabo por condensación entre el grupo carbonilo y una hidracina (2,4-dinitrofenilhidracina).

Cuando se adiciona un álcali a la 2,4-dinitrofenilhidrazona, se produce un color rojo vino, debido a la formación de un compuesto quinoidal. Este color proporciona un ensayo colorimétrico muy sensible leyéndose la absorbancia a 480 nm.

3. Formación de oximas con hidroxilamina

Fundamento

El producto de Condensación de un aldehído o cetona con clorhidrato de hidroxilamina $NH_2OH.HCl$, se conoce con el nombre de oxima.

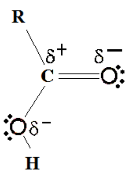
Técnica

Se añade un exceso de clorhidrato de hidroxilamina a la muestra, culminada la reacción, se valora el ácido formado con un álcali estandarizado utilizando detección potenciométrica del punto final (*la detección potenciométrica es necesaria para diferenciar el consumo de álcali debido al HCl formado del consumo por parte del exceso de* $NH_2OH.HCl$)

Interferencias

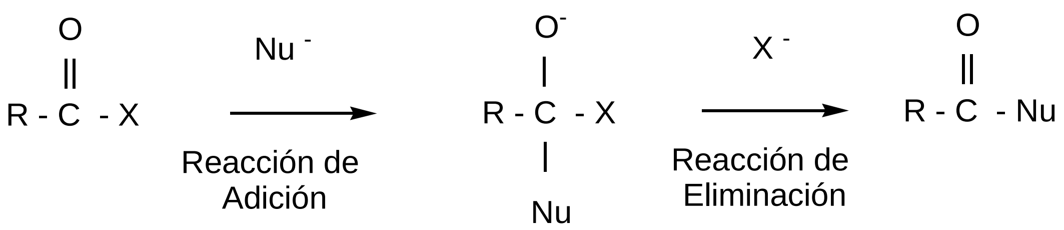
Acetales, cetales y éteres vinílicos se hidrolizan fácilmente ya que la reacción se lleva a cabo en medio ácido.

➲ Ésteres

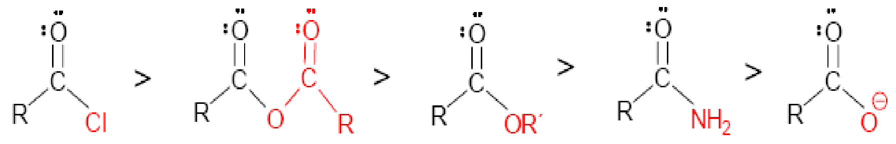


Los derivados de ácidos carboxílicos pueden ser haluros de ácido (RCOCl), anhídridos de ácido (RCOOCOR), ésteres (RCOOR´) y amidas (RCONH2).

Las reacciones de ácidos carboxílicos y derivados tienen lugar mediante un proceso de sustitución por adición-eliminación.



El orden de reactividad de los derivados de ácido para los procesos de adición nucleofílica-eliminación es:



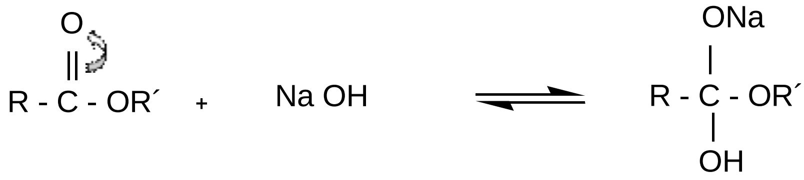
Cloruro de Ácido Anhidrido Éster Amida Carboxilato

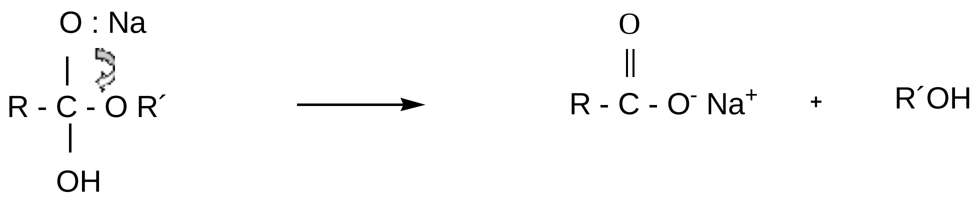
Métodos de Análisis

1. Saponificación

Fundamento

Una base promueve la hidrólisis de los ésteres porque proporciona el reactivo fuertemente nucleofílico oxidrilo que ataca al átomo de carbono electrofílico y desplaza al ion alcóxido. La velocidad de la reacción está controlada por los dos primeros pasos.





Técnica

Se disuelve la muestra en el disolvente seleccionado (agua, alcohol). Se adiciona un exceso conocido de álcali estándar, se calienta a reflujo. Culminada la reacción se deja enfriar la solución, se agrega solución indicadora

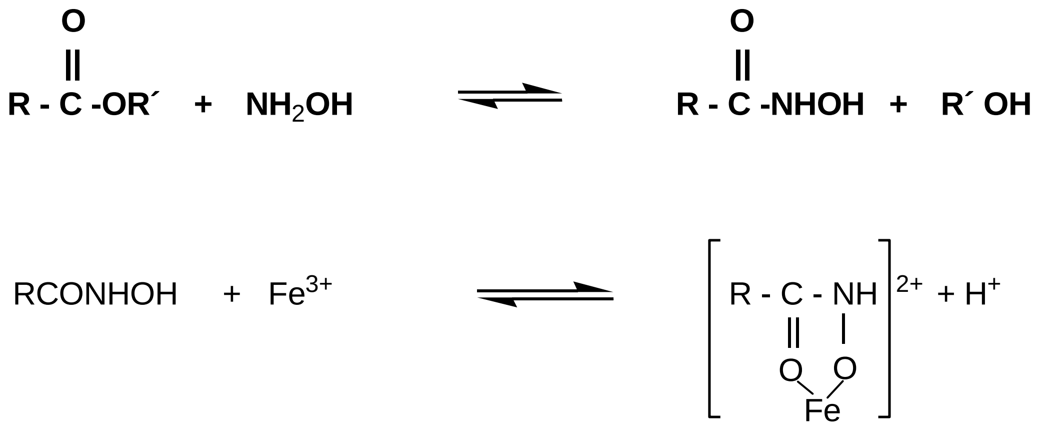
de fenolftaleína, y se valora el exceso de álcali con un ácido estándar. Se debe realizar un ensayo en blanco.

Interferencias

- Cetonas y aldehídos.
- Los ésteres vinílicos no pueden ser determinados debido a que éstos consumen hidróxido.

2. Método colorimétrico con hidroxamato de hierro (III)

Los ésteres (y otros derivados de ácidos carboxílicos) reaccionan con hidroxilamina en presencia de bases fuertes produciendo ácidos hidroxámicos, los cuales forman complejos (1:1) de color púrpura intenso con el ion férrico, cuya absorbancia se lee en la región del visible.



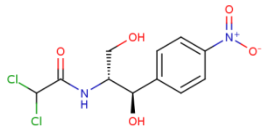
➲ Amidas

Las amidas se forman por reacción de ácidos carboxílicos con amoniaco, aminas primarias y secundarias. La reacción se realiza bajo calefacción, predominando en estas condiciones el ataque nucleofílico que formará la amida.

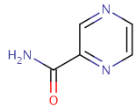
$$CH_3-\overset{\overset{\large O}{\|}}{C}-OH \quad + \quad :NH_3 \xrightarrow{\Delta} CH_3-\overset{\overset{\large O}{\|}}{C}-NH_2 \quad + \quad H_2O$$

Δ: *Calentamiento > 100°C*

Como ejemplo podemos mencionar las siguientes estructuras:



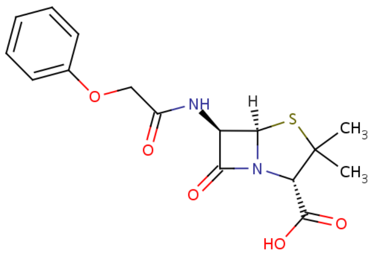
Cloranfenicol



Pirazinamida

Las lactamas son amidas cíclicas obtenidas por condensación, con pérdida de agua, de una molécula que contiene grupos ácido y amino.

La Penicilina V es un agente antibiótico que contiene un anillo *β-lactámico* en su estructura molecular:



Métodos de Análisis

1. Valoración acido base

Técnica

Las amidas son bases muy débiles. Para valorarlas se usa como medio anhídrido acético, como titulante solución estándar de ácido perclórico en ácido acético glacial o dioxano. El punto final se debe determinar por potenciometría usando un electrodo de vidrio modificado. Se recomienda determinar el punto final usando el método de la derivada primera o segunda

(*En el electrodo de vidrio modificado, se ha reemplazado la solución acuosa saturada de ClK por una solución de* ClO_4Li *0.1M preparada en anhídrido acético. El electrodo se estabiliza dejándolo sumergido 12 hs. en anhídrido acético antes de usarlo).*

2. Saponificación

Las amidas son más difíciles de saponificar que otros derivados de ácidos, las condiciones deben ser más drásticas. Se debe usar elevada temperatura y calentamiento a reflujo en presencia de un exceso de álcali (ver Esteres).

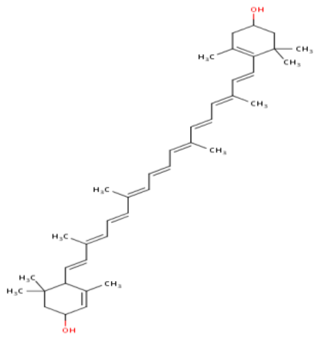
➲ Alquenos

Se considerará a los compuestos que contienen el doble enlace carbono-carbono. El tipo y grado de reactividad química conferido a una molécula por una insaturación carbono-carbono depende de la estructura molecular local.
Un dieno es un compuesto orgánico que tiene dos enlaces dobles.
Un polieno tiene más de dos.
Dependiendo de su posición relativa se distinguen tres tipos de compuestos:

Doble enlace aislado	$CH_2=CHCH_2CH=CH_2$
Dieno conjugado	$CH_2=CHCH=CH_2$
Acumulados	$CH_2=C=CH_2$
Insaturaciones vinílicas	R-CH=CH2
α,β Insaturados	R-CH=CH-X

(X es un grupo sustractor de electrones)

El doble enlace C=C tiene una nube electrónica *p* desde la que se pueden ceder electrones a un atacante electrófilo. Por tanto, la reacción más importante de los alquenos es la adición electrófila.
Los dienos aislados no tienen propiedades especiales y se comportan como alquenos normales. Los acumulados o alenos tienen propiedades estructurales especiales. Pero los más interesantes son los conjugados, que tienen una reactividad muy característica, como por ejemplo los β-Carotenos



β-Carotenos

Métodos de Análisis

1. Método del acetato de mercurio (II)

Fundamento

Se adiciona acetato de mercurio (II) en medio de metanol a los alquenos con dobles enlaces aislados y vinílicos, produciendo un compuesto de adición y ácido acético.

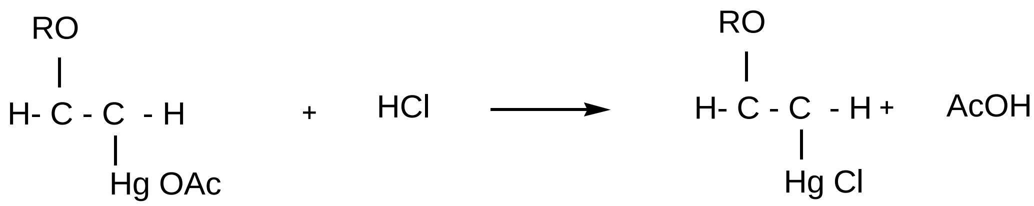
$$R\text{-}CH = CH_2 \;+\; Hg(OAc)_2 \;+\; CH_3OH \longrightarrow R\text{-}\underset{\displaystyle OCH_3}{\underset{|}{CH}}\text{-}\overset{\displaystyle HgOAc}{\overset{|}{CH_2}} \;+\; AcOH$$

Técnica

Este método se puede resolver de dos formas distintas:

- Titulando el AcOH formando con HOK/CH_3OH y fenolftaleína. Se debe hacer un blanco y determinar previamente tiempo y temperatura de reacción (generalmente se trabaja a bajas temperaturas o a temperatura ambiente).
- Agregando un exceso conocido de Ac_2Hg y valorando el exceso con solución de HCl estándar y azul de timol como indicador. Tanto el exceso de Ac_2Hg como el producto de adición formado consumen ácido, pero en distintas proporciones:

$$Hg(OAc)_2 + 2HCl \rightarrow Cl_2Hg + 2AcOH$$



Es decir que el exceso de Ac_2Hg consume 2 moles de HCl por mol y el compuesto formado consume 1 mol de HCl. Se hace un blanco y luego la diferencia entre los equivalentes de HCl consumidos por este blanco y la muestra nos dará el número de equivalentes del alqueno en la muestra.

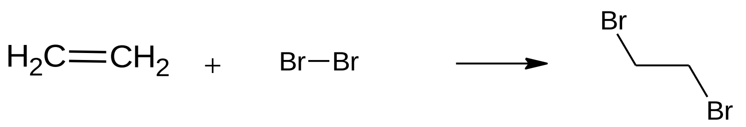
Interferencias

Los dienos conjugados y los α,β insaturados reaccionan pero no cuantitativamente.

2. Método de adición de halógenos

Fundamento

Se produce la adición del reactivo electrofílico al doble enlace C=C presente en alquenos, se pueden valorar compuestos insaturados aislados, conjugados y vinílicos. No todos los dobles enlaces reaccionan de la misma forma, por ejemplo en los compuestos aromáticos los enlaces participan de un sistema conjugado siendo entonces su reactividad menor que la de un sistema aislado.



Técnica

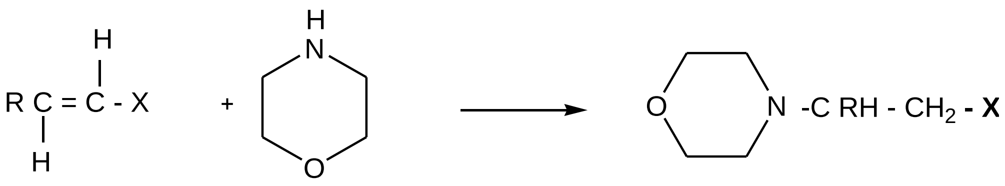
Se añade un exceso de bromo a la muestra, culminada la reacción se adiciona ioduro de potasio inmediatamente se titula con tiosulfato de sodio estandarizado hasta desaparición de color amarillento en el punto final.

Se debe hacer un ensayo en blanco

3. Método de la morfolina para α, β insaturados

Fundamento

Cuando el doble enlace está situado en α,β respecto a un grupo aceptor de electrones (X) la fuerte atracción de electrones de este grupo induce una densidad positiva en el Cβ que es susceptible de ser atacado por reactivos nucleofílicos, como la morfolina, una amina secundaria cíclica, produciéndose la adición al doble enlace de la misma y obteniéndose una amina terciaria.



Técnica

Se añade un exceso de morfolina a la muestra, culminada la reacción, que se debe realizar a temperatura ambiente y a un tiempo entre 5-60 minutos, se acila el exceso de morfolina con anhídrido acético en medio de acetonitrilo e inmediatamente se titula con ácido clorhídrico estandarizado la amina terciaria formada. Se debe realizar un ensayo en blanco.

Interferencias

- Ácidos y bases presentes en la muestra.

Tipo de solvente	De carácter ácido para titulación de bases y sus sales	Relativamente neutro para titulación diferencial de bases	De carácter básico para titulación de ácidos	Relativamente neutro para titulación diferencial de ácidos
Solvente	Ácido acético glacial Anhídrido acético Ácido formica Ácido propiónico Cloruro de sulfurilo	Acetonitrilo Alcoholes Cloroformo Benceno Tolueno Clorobenceno Acetato de etilo Dioxano	Dimetilformamida *n*-butilamina piridina etilendiamina morfolina	Acetona Acetonitrilo Metil etil cetona Metil isobutyl cetona Alcohol *ter*-butílico
Indicador	Cristal violeta Rojo de quinaldina *p*-naftolbenceina alfazurina 2-G verde de malaquita	Rojo de metilo Naranja de metilo *p*-naftolbenceina	Azul de timol Timolftaleina Azo violeta o-nitroanilina p-hidroxiazobenceno	Azo violeta Azul de bromotimol p-hidroxiazobenceno azul de timol
Electrodos	Vidrio/calomel Vidrio/plata/cloruro de plata Mercurio/acetato de mercurio	Vidrio/calomel Calomel/plata/cloruro de plata	Antimonio/calomel Antimonio/vidrio Antimonio/antimonio Platino/calomel Vidrio/calomel	Antimonio/calomel Vidrio/calomel Vidrio/platino

Tabla 1. *Sistemas para titulaciones en medio no acuoso*

Preguntas Orientadoras

1. Cuál es el fundamento de la reacción de acilación para valorar un compuesto con una función alcohólica primaria.
2. Qué métodos colorimétricos conoce para valorar fenoles.
3. Para qué tipo de aminas es aplicable el método de formación de iminas.
4. En qué consiste la volumetría en fase heterogénea.
5. Cómo valoraría una muestra de ácido acetilsalicílico?

Test de Autoevaluación

Las opciones son Verdadero (V) o Falso (F)

1. En la acilación de una muestra, que contiene un grupo hidroxilo, con anhídrido acético el volumen consumido por la muestra es igual a $V_B/2$.

   V / F
2. La siguiente reacción describe la formación de imina:

   $RNH_2 + R'CHO \leftrightarrow R'CH = NR + H_2O$

   V / F
3. Las cetonas reaccionan con Ag_2O.

   V / F
4. Derivados de ácidos carboxílicos y su orden de reactividad en una reacción de adición.

   Éster > Amida > Carboxilato

   V / F
5. Para valorar una amina aromática primaria presente en una materia prima se utiliza la volumetría en fase heterogénea

   V / F
6. Para valorar la función amida presente en un principio activo se utiliza una volumetría ácido base en medio acuoso.

   V / F

7. Muchos principios activos de uso farmacéutico son ácidos o bases débiles y pueden ser valorados utilizando medios no acuosos
   V / F

Bibliografía

1. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VII ed. (2003) Buenos Aires.
2. Critchfield; F. R. (1963) *Organic Functional Group Analysis*. New York, Macimillan.
3. Seyhan Ege.(1997). *Química orgánica: estructura y reactividad, Volumen 2.* Edición Española.
4. Daniel C. Harris (2007). *Análisis Químico cuantitativo.* Barcelona: Reverté, S.A.

CAPITULO 10

La Prueba de Disolución

María Esperanza Ruiz

Introducción

La evaluación de la disolución tiene aproximadamente un siglo de desarrollo. Sin embargo, en las últimas décadas ha suscitado mayor interés, especialmente por su aplicación al estudio de productos medicamentosos sólidos, en los que el proceso de disolución se encuentra relacionado con la biodisponibilidad del fármaco en el organismo.

Para que una molécula con determinada actividad intrínseca pueda convertirse en un fármaco, debe ser capaz de alcanzar su lugar de acción en el organismo. En el caso de fármacos formulados para su administración oral, el proceso de absorción dependerá de su disolución o solubilización bajo condiciones fisiológicas y de su permeabilidad a través de la membrana de las células del tracto digestivo. Por otro lado, si además se trata de una forma farmacéutica solida, deberá ser liberado de ella antes de disolverse.

En consecuencia, la velocidad a la que aquellos principios activos poco solubles en agua se disuelven en el tracto gastrointestinal a partir de la forma farmacéutica se correlaciona con su velocidad de absorción sistémica. Es por ello que el ensayo de disolución es la prueba *in vitro* de elección para estudiar el comportamiento que tendrán los medicamentos *in vivo*, y se ha convertido en un requisito farmacopeico y regulatorio para la evaluación de formas farmacéuticas. Si bien inicialmente se aplicaba exclusivamente a formulaciones sólidas, con el tiempo se ha expandido más allá de los comprimidos y las cápsulas, para abarcar también a los productos de liberación modificada, productos transdérmicos, suspensiones orales, etcétera.

Por lo tanto, es la relación existente entre la disolución de un medicamento y su posterior desempeño *in vivo* el motivo de la relevancia de la prueba de disolución, ya que, con ciertas limitaciones, la misma puede emplearse como elemento predictivo de la biodisponibilidad *in vivo* del fármaco. La FDA define la biodisponibilidad (BD) como la "cantidad y velocidad a la cual el principio activo es absorbido desde un producto farmacéutico y queda disponible en el sitio de acción". Sin embargo, debido a que para la mayoría de los principios activos no es posible conocer nunca su concentración en el sitio de acción, se ha propuesto otra definición según la cual la BD es la "cantidad relativa del medicamento que ha accedido a la circulación general después de su administración, y velocidad a la cual se ha producido dicho acceso". Esta última definición ha sido adoptada por la autoridad sanitaria de nuestro país entre otras, y constituye tanto el fundamento de la determinación práctica de la BD como de su estrecha relación con el ensayo de disolución *in vitro*.

Asimismo, el ensayo de disolución posee otras y muy variadas aplicaciones, las que serán tratadas al final de este capítulo. Entre las principales podemos mencionar su empleo en el control de calidad de medicamentos, para la evaluación de la uniformidad entre lotes, en la etapa de pre-formulación, en estudios de estabilidad y de equivalencia farmacéutica, entre otros.

Por último, para que los resultados de disolución sean comparables y reproducibles, el ensayo debe realizarse según las recomendaciones dadas en la Farmacopea Argentina (FA) y asegurando que el equipo cumple las medidas indicadas en el Capítulo General sobre Ensayo de Disolución ⟨320⟩ de la FA. Se trata de un ensayo complejo donde entran en juego muchas variables, las que deben enmarcarse en los principios de las GLP.

Leyes que rigen la disolución de un sólido

La disolución se define como la transferencia de masa desde un sólido al medio de disolución o solvente que lo rodea. Es una propiedad dinámica que se modifica en el tiempo y que explica el proceso por medio del cual se puede

obtener una mezcla homogénea de un sólido o un líquido en un solvente. Fisicoquímicamente, puede representarse como el proceso inverso a la cristalización, lo que macroscópicamente corresponde a la desintegración de la estructura cristalina bajo la acción del disolvente que la rodea.

En 1897 Noyes y Whitney publicaron el artículo *"Rate of dissolution of solid substances in their own solution"*, el que se convirtió en una de las primeras referencias a la evaluación de la disolución. En dicho artículo, los autores sugieren que la velocidad de disolución (dC/dt) es limitada por una capa estanca de solución saturada que se forma instantáneamente alrededor de las partículas del sólido y a partir de la cual las moléculas difunden al seno de la solución (ecuación 1). Luego, en 1904 Nernst y Brunner establecieron la relación entre la velocidad de disolución y el coeficiente de difusión (*D*), mediante una ecuación derivada de la de Noyes-Whitney por la aplicación de la ley de difusión de Fick (ecuación 2). Las ecuaciones correspondientes son las siguientes:

$$\frac{dC}{dt} = k \cdot (C_s - C) \tag{1}$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh} \cdot (C_s - C) \tag{2}$$

En las ecuaciones anteriores, dC/dt representa la velocidad de disolución de la droga; k es una constante; C_s es la concentración de la droga en la capa estanca (concentración de saturación); C es la concentración en el seno de la solución; S es el área superficial del sólido; D es el coeficiente de difusión, V es el volumen de solución y h es el espesor de la capa estanca.

En 1931 Hixson y Crowell expresaron el área superficial (*S,* ecuación 2) en función de la masa *m*. Considerando partículas esféricas, se tiene que S es proporcional a $m^{2/3}$ y eso permite la aplicación de los cálculos a la disolución de partículas compactas. Haciendo los cálculos correspondientes e integrando luego, se obtiene una ecuación que relaciona al tiempo con la raíz cúbica de la masa (ecuación 3). Cuando las concentraciones disueltas son pequeñas y por

lo tanto la diferencia (Cs – C) puede aproximarse constante, esta ecuación se puede expresar como:

$$w_0^{1/3} - w^{1/3} = k_2 \cdot t \qquad (3)$$

Las tres ecuaciones anteriores pueden ser consideradas como diferentes expresiones del “modelo de la capa de difusión”. Es decir, este modelo sería la herramienta empleada para explicar físicamente el proceso de disolución, de la que luego se derivan las diferentes ecuaciones. En todos los casos, la etapa limitante es la difusión de las moléculas a través de la capa estanca de líquido (de espesor h) alrededor de la superficie sólida.

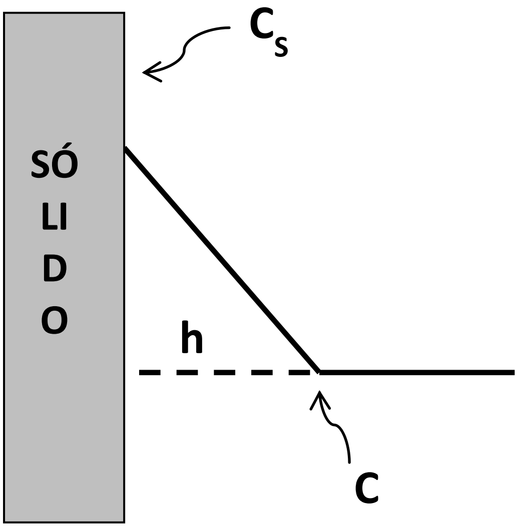


***Figura 1**. Esquema de la disolución de una partícula esférica en un flujo laminar que permita suponer la existencia de una capa de líquido estanca de espesor uniforme h adsorbida alrededor de cada partícula. C_S es la concentración de la droga en la capa estanca (concentración de saturación) y C es la concentración en el seno de la solución*

El modelo anterior, si bien fue uno de los más aplicados y desarrollados, no fue el único propuesto. El modelo de la barrera interfacial, propuesto inicialmente por Wilderman en 1909, postulaba que la etapa limitante del proceso de disolución era el transporte a través de la interfaz (en lugar de la difusión a través de la capa estanca) debido al elevado valor de energía de activación para el mismo. En 1951 Danckwerts propone otra teoría llamada de

“renovación de superficie”, que suponía la existencia de conjuntos o “paquetes” macroscópicos de disolvente que se desplazan hacia el sólido, y seguidamente, por un simple proceso de difusión, cada “paquete” absorbe soluto y luego es reemplazado inmediatamente por otro fresco, generándose así un ciclo de disolución continuo.

A pesar de lo discutido hasta aquí, no existe actualmente una única teoría que logre explicar satisfactoriamente el comportamiento de disolución de los sólidos. Y si tenemos en cuenta que en el caso de productos farmacéuticos la situación es más compleja ya que no suelen tratarse de sólidos puros sino de mezclas de componentes (activo + excipientes), la situación es aún más desfavorable. Sin embargo, las teorías expuestas resultan útiles para analizar, por ejemplo, la influencia que tendrán distintos factores experimentales sobre la velocidad de disolución (agitación, área superficial).

De Noyes-Whitney a la actualidad

A pesar de los avances en el estudio de la disolución *in vitro* hasta aquí descriptos, los mismos pertenecían al campo de la ingeniería química, mientras que para las ciencias farmacéuticas la importancia de este fenómeno no fue reconocida de manera generalizada hasta el comienzo de los años 50. En 1930 comenzaron a aparecer experimentos de disolución bajo la forma de correlaciones *in vitro-in vivo*, y en 1934 fue la primera vez que un libro oficial, la farmacopea Helvética de Suiza, incluyó el test de desintegración para comprimidos, que se realizaba en agua a 37 ºC con agitación constante. Sin embargo, recién en 1950 dicho test se convirtió en oficial para la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 14).

El primer test oficial de disolución para formas sólidas de dosificación fue incorporado en la USP 18 (1970). Luego, debido al creciente interés en los tópicos de disolución y absorción gastrointestinal, se produjo una explosión en el número de monografías con requerimientos de disolución en las siguientes ediciones de la USP/NF, y a partir de allí también comenzaron a aparecer los

primero equipos de disolución o “disolutores”, los que hasta el día de hoy consisten en un baño de agua con control de temperatura donde se sumergen seis vasos que contienen el medio de disolución y el producto a ensayar, agitados a velocidad variable (Figura 2). Recién en 1985 se publicó un capítulo general llamado “Drug Release” en la USP 21. Para el año 1990, había 23 monografías para formas farmacéuticas de liberación modificada en USP 22-NF 18, y en 1997 aparecen las guías de la FDA para disolución de formas sólidas orales (de liberación inmediata, modificada y prolongada) que aún permanecen vigentes.

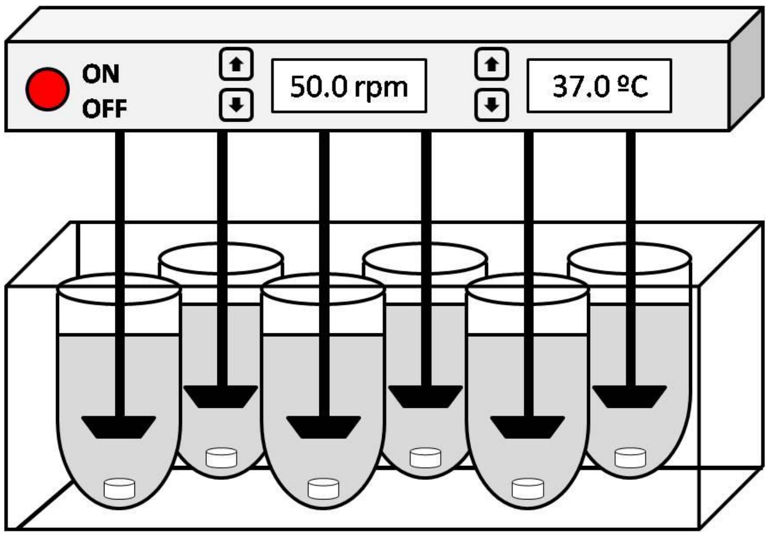


Figura 2*. Esquema de un equipo de disolución. Los vasos que contienen el medio donde se va a disolver el principio activo (al menos seis) se sumergen en un baño de agua con control de temperatura y se agitan a la velocidad deseada (50 rpm, por ejemplo) mediante un vástago central (en el esquema, con forma de paleta).*

Factores que influyen en la velocidad de disolución

Dada la complejidad del proceso de disolución, son numerosos los factores que pueden modificar la velocidad a la que se produce. Estos factores pueden clasificarse en:

A) Factores que dependen del medio de disolución

Son factores experimentales, variables críticas a definir durante los ensayos.

Agitación

De acuerdo con la teoría de Nernst y Brünner, el espesor de la capa líquida que rodea a las partículas es inversamente proporcional a la velocidad de agitación. Por lo tanto, si aumenta la intensidad de la agitación, disminuye el espesor del film, favoreciendo la difusión de las moléculas al seno de la solución.

Se han desarrollado otros modelos más complejos para explicar la relación entre la velocidad de la disolución y la intensidad de la agitación, sobre todo en los casos donde no se puede suponer flujo laminar. Pero en todos los casos, la relación entre estas variables es directa: mayor disolución a mayor agitación.

Temperatura

Según la ley de Le Chatellier, un proceso endotérmico es favorecido por el aumento de temperatura: como la mayoría de los sólidos presentan calores de disolución positivos, el aumento de temperatura favorece su solubilidad y velocidad de disolución.

Por otro lado, la ecuación de Nernst-Brunner (ecuación 2) muestra la relación directamente proporcional entre velocidad de disolución y coeficiente de difusión de una molécula que, acorde a la ecuación de de Stokes-Einstein, aumenta con la temperatura (ecuación 4):

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta r N} \qquad (4)$$

En la ecuación anterior, D: coeficiente de difusión; R: constante de los gases, T: temperatura (ºK); η: viscosidad; r: radio de la partícula y N: número de Avogadro.

Composición del medio de disolución

El ***pH*** es importante en todos los productos de carácter iónico, ya que la solubilidad de un electrolito varía en función del pH. Para un ácido débil:

$$C_s = C_0 + [A^-] \quad (5)$$

Donde C_0 es la solubilidad intrínseca del ácido no disociado y Cs la solubilidad total. Por lo tanto la velocidad de disolución sería:

Para un ácido débil: $$\frac{dm}{dt} = K \cdot C_0 \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]}\right) \quad (6)$$

Para una base débil: $$\frac{dm}{dt} = K \cdot C_0 \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a}\right) \quad (7)$$

A partir de las expresiones anteriores puede verse que la velocidad de disolución de un ácido aumenta si se incrementa el pH, mientras que para las bases débiles sucede lo contrario.

Por otro lado, la ecuación 4 muestra también que el coeficiente de difusión de una molécula es inversamente proporcional a la **viscosidad** del medio, por lo tanto a mayor viscosidad del medio, menor velocidad de disolución.

En cuanto a las **sales presentes en el medio de disolución**, éstas pueden actuar por dos mecanismos, “salting in” (aumentan la solubilidad, por ejemplo la urea) o “salting out” (disminuyen la solubilidad al hidratarse a expensas del agua libre, ejemplo NaCl).

Otro factor que puede influir es la **tensión superficial.** Los agentes tensioactivos provocan una disminución de la tensión superficial y contribuyen así a aumentar la velocidad de disolución de un sólido mediante tres mecanismos principales:

i) Pueden *mejorar la humectación de las partículas*, es decir, favorecer el contacto entre éstas y el disolvente y así aumentar la superficie libre para el ataque por el líquido disolvente.

ii) Pueden aumentar la solubilidad a través de un mecanismo de *falsas emulsiones o soluciones*. A partir de una cierta concentración, cuando el tensioactivo ya no se encuentra en solución verdadera sino que se encuentra en forma micelar, el poder solvente frente a las sustancias hidrófobas aumenta.

iii) Los agentes tensioactivos también pueden influir sobre los *fenómenos de difusión* asociados a los procesos de disolución.

B) Factores que dependen del sólido a disolver

Son factores no modificables durante los ensayos.

Solubilidad

Es un parámetro termodinámico que representa la concentración de la solución de un fármaco en equilibrio con el soluto. Según la ecuación de Noyes-Whitney (ecuación 1) la solubilidad (C_s) es el factor más importante en la velocidad de disolución. Varios factores pueden modificar la solubilidad de una sustancia sólida:

La solubilidad depende principalmente de la **naturaleza química del sólido.** Los electrolitos se disuelven fácilmente en agua, mientras que en el caso de sustancias que contienen a la vez grupos polares y no polares, su solubilidad en agua depende de la relación entre esos grupos. Por otro lado, en el caso de sustancias ácidas o básicas, también se puede modificar la solubilidad según se utilice la forma libre (genéricamente denominada “forma base”) o una sal.

El **polimorfismo,** es decir la capacidad de una sustancia de cristalizar en más de un sistema, también incluye en la solubilidad, ya que cada polimorfo posee propiedades físicas diferentes, entre ellas el punto de fusión, la solubilidad y la velocidad de disolución.

En algunos casos, la presencia de **impurezas** o trazas de impurezas, no detectables por los métodos químicos que suelen ser aceptados por las farmacopeas, pueden inhibir la disolución.

Área superficial

Depende principalmente del tamaño de las partículas, aunque también de su porosidad y forma geométrica. Al disminuir el tamaño de las partículas aumenta su área superficial *S*, y con ella la velocidad de disolución (ver ecuación 2).

C) Factores tecnológicos y de formulación:

Al igual que los anteriores, estos factores no pueden modificarse durante el ensayo, sino solamente en la etapa de preformulación. Tanto los procedimientos de fabricación (mezcla, granulación, fuerza de compresión) como los excipientes que acompañan a los principios activos en la formulación pueden influir de alguna manera en el proceso de disolución.

Excipientes

Los **diluyentes**, que se emplean para dar volumen a un comprimido (ej: sacarosa, lactosa), pueden generar comprimidos demasiado consistentes, con menores velocidades de disolución. También se han indicado efectos de adsorción y complejación de algunos fármacos con diluyentes.

Por el contrario, los **desintegrantes** contribuyen a la disgregación rápida en el fluido gastrointestinal (ej. almidones), y por lo tanto suelen aumentar la cantidad de desintegrante aumenta la velocidad de disolución.

Los excipientes que se utilizan para dar resistencia mecánica a los comprimidos (también llamados **aglutinantes**) en general producen un aumento en el tiempo de desintegración y, por lo tanto, la disminución de la velocidad de disolución. Los **lubricantes**, por su parte, también disminuyen la velocidad de disolución. Dichos excipientes, que se incluyen en la mezcla para evitar la adherencia y mejorar la fluidez de los polvos, en porcentaje elevado impiden la humectación de las partículas, disminuyendo así su disolución (ej: estearato de magnesio)

Método de granulación

De acuerdo con el método empleado pueden obtenerse comprimidos de diversa resistencia mecánica, la cual influye en la velocidad de disolución del principio activo.

Fuerza de compresión

Durante la compresión es difícil mantener las características granulométricas de los principios activos. La velocidad de disolución, según algunos autores, aumenta con el aumento de la fuerza de compresión, llega a un máximo y luego decrece hasta un nivel constante. Otros autores consideran que cuando se aplica una fuerza débil, las partículas se aglomeran, y disminuyen la velocidad de disolución, pero si aumenta la fuerza llega un punto en que las partículas se rompen, y la velocidad de disolución aumenta hasta un máximo para luego disminuir.

Envejecimiento

La velocidad de disolución de comprimidos envejecidos puede ser menor que la de los recién elaborados. Este efecto se puede deber a diferentes causas, como la presencia de ciertos excipientes que aumentan la dureza de los comprimidos en el tiempo, o al efecto del agua residual del granulado.

Objetivos y aplicaciones del ensayo de disolución

Las pruebas de disolución como hoy las conocemos son métodos de control *in vitro* que permiten evaluar las características de liberación de un fármaco desde su forma farmacéutica a un medio de disolución apropiado, en condiciones experimentales cuidadosamente estandarizadas. La evaluación de la disolución es un ensayo con numerosos objetivos y aplicaciones. Dentro de las aplicaciones rutinarias del ensayo de disolución podemos citar:

- Evaluar materias primas. Si se emplea una materia prima con pobres características de disolución, muy posiblemente se verá afectado el comportamiento de disolución del producto terminado. Para realizar este ensayo se coloca la droga pura en una cápsula de gelatina.
- Servir como guía para el desarrollo de formas farmacéuticas orales durante la etapa de preformulación.

- Monitorear la calidad, consistencia y estabilidad de formulaciones en el tiempo, ya que debe asegurarse que los parámetros iniciales de disolución se mantengan durante toda la vida útil del producto. En este sentido, la prueba de disolución se convierte en un indicador de del proceso de biocaducidad.
- Determinar la uniformidad entre diferentes lotes producidos de un mismo medicamento.

Las anteriores, sin embargo, no son las únicas aplicaciones de este ensayo. La valiosa información que se obtiene al evaluar el desempeño de disolución de los productos farmacéuticos, como así también la estrecha relación entre dicha información y el posterior desempeño *in vivo* del producto, dan lugar a otra serie de aplicaciones biofarmacéuticas de estos ensayos, las cuales serán brevemente discutidas al final de este capítulo.

Equipos de disolución

La USP codifica siete aparatos de disolución:

1) Canastillo
2) Paleta rotatoria
3) Cilindro reciprocante
4) Celda de flujo
5) Paleta sobre disco
6) Cilindro rotatorio
7) Disco reciprocante

Los más usados son los equipos 1 y 2, y son los únicos incluidos en la FA VII Ed. Ambos equipos constan de un baño de agua en el que se sumergen al menos seis vasos de 1 litro de capacidad, los que contienen el medio de disolución. Durante el ensayo, la temperatura de dicho baño se fija en 37 ± 0,5 ºC (productos de administración oral). Por otro lado, los equipos poseen un motor giratorio (velocidad variable entre 25 a 200 rpm, aproximadamente) que acciona elementos de agitación o vástagos sumergidos en el centro de cada

vaso. Los aparatos 1 y 2 se diferencian entre sí por el método de agitación del medio de disolución contenido en los vasos:

Aparato 1: en el extremo inferior del vástago se coloca un canastillo de acero inoxidable con malla de 0,12 mm de abertura, en el que se coloca la muestra a analizar y se sumerge en el medio de disolución hasta 2,5 cm del fondo (Figura 3A).

Aparato 2: utiliza vástagos cuyo extremo inferior tiene forma de paleta (de acero inoxidable o recubierta de un polímero adecuado, Figura 3B). La muestra se introduce directamente en los vasos y por gravedad se deposita en el fondo.

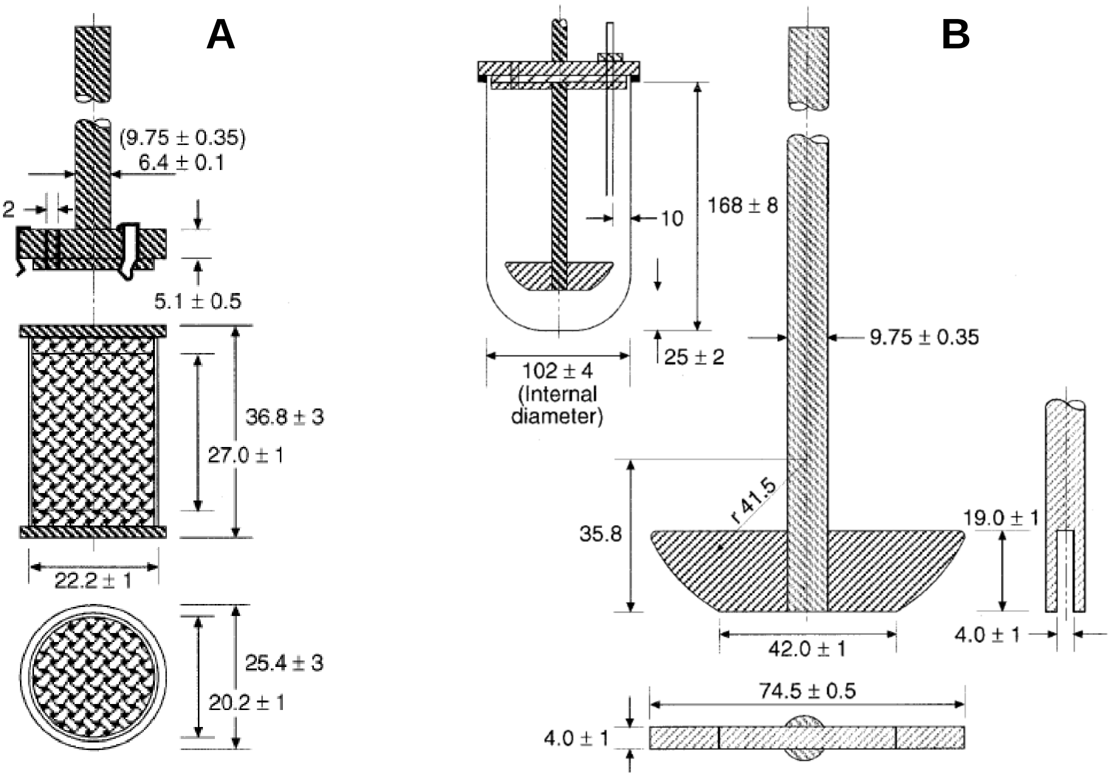


Figura 3. *Esquemas de los equipos (las medidas son en mm). A: vástago correspondiente al aparto 1 o canastillo, B: aparato 2 o paleta.*

Control del equipo – Calibración

- Comprobar la rectitud del eje, visualmente y/o con una regla.

- Examinar el revestimiento de la paleta o del canastillo para detectar posibles grietas en el mismo.
- Comprobar que la paleta o el canastillo posean las dimensiones y distancias al eje especificadas.
- Montar la paleta o el canastillo en el equipo y comprobar tanto que su posición sea centrada como que la distancia al fondo del recipiente sea la adecuada (25 ± 2 mm).
- Controlar el aparato para garantizar la velocidad de rotación, la que debe mantenerse dentro de ± 4% del valor especificado durante todo el ensayo.
- Controlar el nivel de vibración de todo el aparato (con un medidor de vibraciones), y eliminar cualquier fuente de vibración posible.
- Inspeccionar el estado de limpieza (como así también la presencia de grietas o rayas) de la paleta o el canastillo, y de todas las partes del equipo que vayan a estar en contacto con el medio de disolución.
- Calibrar periódicamente el sistema con calibradores adecuados, lo que también se denomina *calibración química*.

Respecto a este último punto, la USP ofrece dos tipos de calibradores: tabletas o comprimidos desintegrables (Prednisona 50 mg) y no desintegrables (Ácido Salicílico 300 mg), los cuales poseen tiempos fijos de disolución bajo determinadas condiciones experimentales.

Test de disolución

Para el control de calidad de productos orales de liberación inmediata las farmacopeas indican, en las monografías correspondientes, las condiciones en las que se debe realizar el *test* de disolución. Bajo dichas condiciones experimentales, se ensayan seis unidades del producto en cuestión y, a un tiempo que también se encuentra especificado en dicha monografía, se toma una muestra de cada vaso y se cuantifica el principio activo disuelto, el cual debe haber superado cierto porcentaje de disolución para cumplir con dicho

test. Por lo tanto, se trata de un ensayo a un único tiempo, que sólo permite determinar si el producto evaluado cumple con los requisitos de disolución establecidos en la monografía correspondiente.

Las condiciones que se encuentran en el apartado correspondiente al test de disolución en la monografía individual de un producto son las siguientes:

Equipo: típicamente, aparatos 1 o 2.

Temperatura: para productos de administración oral, siempre es 37 ± 0,5 ºC

Medio de disolución: se indica qué medio utilizar y qué volumen del mismo. Si el medio es una solución buffer, se debe ajustar el pH hasta ± 0,05 unidades del valor establecido.

Agitación: expresada en rpm

Especificación o tolerancia: se expresa como dos datos. Un valor *Q*, que es un %Disuelto (sobre valor declarado –SVD-) a un tiempo dato *t* (tiempo al que se debe alcanzar dicho %D.

Tipo de muestreo: en la mayoría de los casos el muestreo es *individual*, es decir se toma una muestra de cada vaso y se analizan por separado, obteniéndose seis valores de %Disuelto (%D). Pero en algunos casos las farmacopeas pueden requerir muestreo *unificado*, según el cual las seis muestras obtenidas se juntan para formar una única muestra que se analiza.

Método analítico: empleado para la determinación del %D en las alícuotas extraídas del equipo de disolución.

Por lo tanto, la realización experimental de un test de disolución consiste en los siguientes pasos:

∗ Preparación del equipo: se coloca el volumen correspondiente de medio de disolución, previamente desgasificado, en los vasos del equipo, se inicia la agitación a la velocidad estipulada en la monografía correspondiente y se espera a que el sistema alcance la temperatura del ensayo, 37± 0,5 ºC.
∗ Se pesan los comprimidos o unidades de dosificación a ensayar
∗ Una vez alcanzada la temperatura, se coloca cada comprimido en un vaso, a la vez que se comienza a cronometrar el tiempo. Generalmente se deja

una diferencia de algunos segundos entre vaso y vaso, de manera de tener tiempo de muestrear posteriormente.

∗ Al cumplirse el tiempo establecido en la monografía, se extrae una muestra de cada vaso (con la diferencia de tiempo con que se colocaron los comprimidos) de aproximadamente 5 o 10 ml (exactamente medidos).

Las muestras se deben tomar a una altura equivalente a la mitad de distancia entre la superficie del medio de disolución y el borde superior de la paleta o canastilla, y a no menos de 10 mm de la pared del vaso.

∗ Se deben separar todas las partículas sólidas que pudieran estar presentes en las muestras, por lo que las mismas deben ser filtradas o centrifugadas. En el caso de filtración, se debe verificar previamente (durante la validación) que el sistema de filtración no adsorba al principio activo ni libere sustancia al filtrado.

∗ Se analizan las muestras así tratadas por un método adecuado (UV, HPLC). Pueden analizarse directamente o previa dilución de las mismas en el medio de disolución

∗ Se calcula el porcentaje disuelto en cada una de ellas por comparación de los resultados obtenidos respecto a una solución de referencia preparada el mismo día de trabajo.

Lo anterior es válido para la mayoría de los productos orales de liberación inmediata (LI). Sin embargo, existe otro tipo de productos que requieren condiciones de disolución especiales:

- Productos de liberación prolongada (LP): sus monografías poseen la misma información que en el caso de LI, excepto que se debe muestrear a 3, 4 o 5 tiempos, y para cada uno se especifica un valor de Q o rango de Q.
- Productos de liberación retardada con cubierta entérica (LR): las farmacopeas codifican dos ensayos posibles (*Ensayos A o B*), ambos con una etapa ácida inicial (2 hs en HCl) y etapa buffer de 45 min. La diferencia

entre ambos ensayos consiste en la forma en que se produce el cambio de un medio al otro.

Criterios de Aceptación

En el caso de productos LI, y a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos se cumplen si la cantidad de principio activo disuelto al tiempo especificado cumple el criterio de aceptación (Tabla 1). En caso que los resultados no se ajusten al límite especificado en E1, continuar el ensayo con E2 y si no cumple con la exigencia de E2, proseguir hasta E3. El valor de Q que se encuentra en la tabla es el especificado en la monografía correspondiente al producto en cuestión. Los valores de 5, 15 y 25% en la Tabla 1 corresponden a porcentajes SVD, de modo que estos valores y Q están en los mismos términos.

Etapa	Unidades ensayadas	Criterios de aceptación
E1	6	Cada unidad no debe ser menor de Q + 5%
E2	6	El promedio de 12 unid.(E1 + E2) debe ser igual o mayor de Q y ninguna unidad menor de Q-15%
E3	12	El promedio de 24 unid.(E1 + E2+ E3) debe ser igual o mayor de Q, no más de 2 unidades menores de Q-15% y ninguna unidad menor de Q-25%

Tabla 1. *Aceptación para muestreo individual de productos LI*

Etapa	Unidades ensayadas	Criterios de aceptación
E1	6	El promedio disuelto debe ser igual o mayor de Q+10
E2	6	El promedio de 12 unid.(E1 + E2) debe ser igual o mayor de Q+5%
E3	12	El promedio de 24 unid.(E1 + E2+ E3) debe ser igual o mayor de Q

Tabla 2. *Aceptación para muestreo unificado de productos LI*

En el caso de productos LP, la monografía correspondiente especificaba 3, 4 o 5 tiempos de muestreo, con sus respectivos valores de Q o rangos de Q (generalmente, se especifican rangos para los tiempos iniciales e intermedios, y un valor único de Q para el tiempo final). Los requisitos se cumplen si la cantidad de principio activo disuelto a cada tiempo especificado cumple el criterio de aceptación (Tabla 2). Al igual que para productos LI, si los resultados no se ajusten al límite especificado en E1, se continúa con E2 y si no cumple con la exigencia de E2, hasta E3.

Eta pa	Unidades ensayadas	Criterios de aceptación
E1	6	Ningún valor individual fuera de los rangos establecidos
E2	6	El promedio de 12 unid. debe estar dentro del rango establecido, y ningún valor individual debe representar más del 10% fuera del rango. Al tiempo final, ningún valor debe estar más del 10% por debajo del límite establecido.
E3	12	El promedio de 24 unid. debe estar dentro del rango establecido. No más de 2 unid deben representar más del 10% fuera del rango y ninguna unidad representa más del 20% fuera del rango. Al tiempo final, no más de 2 deben estar más del 10% por debajo del límite establecido y ninguna más del 20% por debajo de dicho límite.

Tabla 3. *Aceptación para productos LP*

En el caso de productos LR, la monografía correspondiente especifica si debe realizarse el ensayo A o B, como así también la tolerancia para la etapa buffer del ensayo. Una vez realizado el ensayo completo, los requisitos se cumplen si, **durante la etapa ácida**, la cantidad de principio activo disuelto a cada tiempo especificado cumple el criterio de aceptación presentado en la Tabla 3. Para la **etapa buffer**, se aplican los mismos criterios que para productos LI (Tabla 1).

Etapa	Unidades ensayadas	Criterios de aceptación
E1	6	Ningún valor individual excede el 10% disuelto
E2	6	El promedio de 12 unid.(E1 + E2) no es mayor del 10% disuelto y ninguna unidad individual es mayor al 25%
E3	12	El promedio de 24 unid.(E1 + E2+ E3) no es mayor del 10% disuelto y ninguna unidad individual es mayor al 25%

Tabla 4. *Aceptación para la etapa ácida de productos LR*

Perfil de disolución

A pesar de que el test de disolución es el ensayo oficial codificado, una única determinación (único tiempo de muestreo) no permite caracterizar la forma farmacéutica, y por lo tanto resulta de interés evaluar y comparar *perfiles de disolución*: registros del %Disuelto (SVD) en función del tiempo. Además de los objetivos generales ya mencionados, la obtención de un perfil de disolución también permite:

- Determinar el orden cinético del proceso de disolución
- Determinar constantes de velocidad del proceso de disolución
- Detectar y cuantificar tiempos de latencia
- Determinar cambios en el proceso de disolución

Los perfiles de disolución se pueden llevar a cabo siguiendo las mismas condiciones experimentales establecidas para el *test de disolución* u otras diferentes, según sea el objetivo. La metodología a seguir es similar a la del test, con la diferencia de que se toman muestras a varios tiempos (por ejemplo, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos) para poder obtener luego la curva de %D vs. tiempo (figura 4).

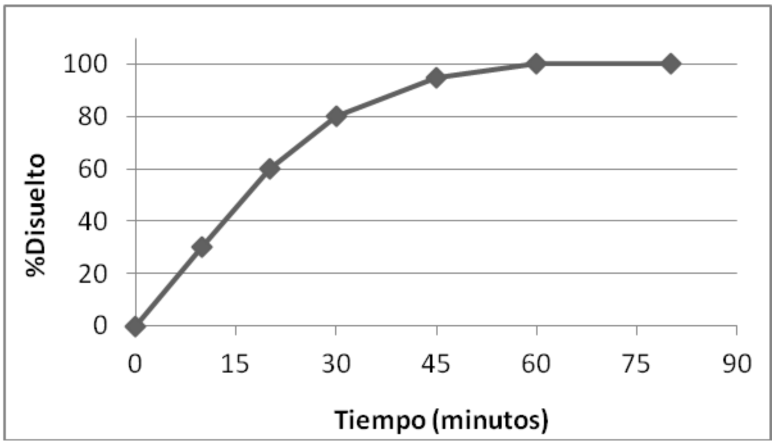


Figura 4. *Perfil de disolución*

Por otro lado, el muestreo puede hacerse con o sin reposición, según se reemplace o no el volumen extraído de cada vaso, a cada tiempo, por un volumen igual de medio fresco. En el caso de ser con reposición, es necesario que el equipo cuente con al menos 7 vasos, de manera de disolver las 6 unidades simultáneamente y tener medio fresco para reponer (en iguales condiciones de agitación y temperatura) en el séptimo vaso.

En cuanto a los cálculos, cuando se cuantifica la concentración del principio activo disuelto en cada vaso, se debe tener en cuenta que:

- Cuando se calculan los mg encontrados a un tiempo dado, debe sumarse la masa retirada en las alícuotas tomadas en los tiempos anteriores.
- Si se trata de un perfil sin reposición, los cálculos deben contemplar la disminución de volumen de los vasos por las sucesivas extracciones de muestras.

Comparación de perfiles de disolución

Con el aumento de relevancia de los estudios de disolución *in vitro* de productos farmacéuticos, al punto de permitir reemplazar a los estudios *in vivo* en ciertas circunstancias, aumentó también la discusión acerca de los métodos

empleados para comparar dichos datos, como asimismo acerca de qué criterio de similitud aplicar.

En la década de los 90, aparecieron en la literatura científica numerosas propuestas de métodos útiles para la comparación de perfiles de disolución. Estos métodos pueden clasificarse en tres categorías:

* Métodos independientes del modelo
* Métodos estadísticos basados en ANAVA
* Métodos dependientes del modelo

Métodos independientes del modelo

Son aquellos que permiten comparar perfiles de disolución sin necesidad de ajustar los datos a un modelo o ecuación que los represente. Incluyen, entre otros, a los métodos matemáticos de cálculo de índices de diferencia/similitud, como los factores f_1 y f_2, y también la comparación de parámetros obtenidos a partir de los perfiles, como el área bajo la curva (ABC) y/o la eficiencia de disolución (ED).

El más conocido de los métodos empleados para comparar perfiles de disolución, posiblemente por ser el método actualmente exigido por la mayoría de los agencias regulatorias de medicamentos, es el factor de similitud f_2:

$$f_2 = 50 \times log\left\{\left[1 + (1/n)\sum_{t=t_1}^{t_n}(R_t - T_t)^2\right]^{-0,5} \times 100\right\} \qquad (8)$$

Donde R_t y T_t son los %D promedio al tiempo t. Los mismos autores que desarrollaron el factor de similitud también desarrollaron el de diferencia, f_1:

$$f_1 = \left\{\frac{\sum_{t=t_1}^{t_n}(R_t - T_t)}{\sum_{t=t_1}^{t_n} R_t}\right\} \times 100 \qquad (9)$$

Los perfiles se consideran *similares* si el valor del f_2 entre ellos es mayor o igual a 50, y el f_1 menor a 15. Requisitos para el cálculo del factor de similitud f_2:

- Los %D de los dos productos a comparar deben haber sido obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales, y los tiempos de muestreos deben haber sido los mismos en ambos casos.
- Para el cálculo, se considerarán todos los valores por debajo y sólo uno por encima del 85% disuelto, como mínimo 3 tiempos sin considerar el cero.
- Para que puedan usarse los %D promedio, el coeficiente de variación (CV) del primer tiempo considerado debe ser menor al 20%, mientras que para los tiempos restantes debe ser menor al 10%.
- No es adecuado el uso del factor de similitud f_2 en el caso de productos de rápida o muy rápida disolución (más del 85% disuelto en 15 minutos).

Otro método consiste en calcular el área bajo la curva (ABC), por el método de los trapecios por ejemplo, y/o la eficiencia de disolución (ED), dada por la ecuación 10:

$$ED = \frac{\int_{t_1}^{t_2} D_{(t)} \cdot dt}{\%D_{max} \times (t_2 - t_1)} \times 100 = \frac{ABC_{0-T}}{\%D_{max} \times T} \times 100 \qquad (10)$$

Donde $\%D_{(t)}$ es el porcentaje disuelto al tiempo t, $\%D_{max}$ es el máximo disuelto, correspondiente al último tiempo T, y ABC_{0-T} es el área bajo la curva desde cero a T. Una vez obtenidos los valores de ABC y ED para cada comprimido individual de las dos formulaciones que se desean comparar, se deben evaluar estadísticamente mediante un Análisis de Varianza (ANAVA), e incluso se puede calcular el intervalo de confianza del 90% para el cociente de medias (IC90%).

Métodos estadísticos basados en ANAVA

Estos métodos tratan al porcentaje disuelto como variable aleatoria, y la someten a un análisis de varianza tomando a la formulación como única variable de clase (monofactorial) y comparando tiempo a tiempo, o considerando a la formulación y el tiempo (bifactorial) como variables de clase o factores en forma simultánea, bajo la hipótesis nula de similitud.

Sin embargo, su aplicación no es estrictamente correcta ya que se viola la hipótesis de independencia debido a la correlación entre el %Disuelto y el tiempo. Y más allá de eso, estos métodos de comparación suelen resultar sobre-discriminantes, detectando diferencias “estadísticas” en lugar de “biofarmacéuticas” entre los perfiles que se están comparando.

Métodos dependientes del modelo

Incluyen diferentes formas estadísticas de comparación de perfiles, con el denominador común de precisar, todas ellas, una etapa previa de modelado de los datos, de manera de ajustarlos a ecuaciones que describan su evolución temporal. El criterio de selección del modelo, así como la interpretación de sus parámetros son desventajas de estos métodos. Luego de ajustados los datos, éstos pueden compararse de diversas maneras, tales como la prueba T^2 de Hotelling o mediante el método de “regiones de similitud” propuesto por Sathe y colaboradores.

Algunas de las ecuaciones matemáticas no-lineales más empleadas para el ajuste de datos fueron de disolución pueden verse en la Tabla 4 a continuación:

Modelo	Ecuación
Primer Orden	$\%D(t) = \%D_{máx} \cdot [1 - \exp(-k \cdot t)]$
Gompertz	$\%D(t) = \%D_{máx} \cdot \exp\{-a \cdot \exp[-b \cdot \log(t)]\}$
Logístico	$\%D(t) = \%D_{máx} \cdot \left\{\frac{\exp[a+b \cdot \log(t)]}{1+\exp[a+b \cdot \log(t)]}\right\}$
Weibull	$\%D(t) = \%D_{máx} \cdot \{1 - \exp[-a \cdot (t)^b]\}$

Tabla 5. *Modelos matemáticos con sus respectivas ecuaciones empleados para el ajuste de los datos %Disuelto vs. tiempo*

A pesar de que se han postulado otros modelos matemáticos para ajustar los datos de %Disuelto vs. tiempo, los cuatro descriptos en la tabla anterior son los más utilizados por su mejor ajuste a datos provenientes de formas sólidas de liberación inmediata.

Para ajustar datos experimentales a una ecuación o modelo se trabaja con programas estadísticos adecuados (Systat, Infostat, etcétera), los que buscan de manera iterativa los valores de los parámetros de la ecuación que estamos ensayando que mejor ajustan a los datos experimentales. Luego, una vez que el programa arroja los valores de los parámetros de cada ecuación para el mismo conjunto de datos experimentales, se debe elegir entre ellas. Existen diferentes formas para ello, pero una muy sencilla e informativa consiste en realizar el test estadístico de *Lack of fit* (falta de ajuste) a los datos ajustados a los diferentes modelos, de manera de determinar estadísticamente si el ajuste es aceptable en todos los casos.

Por último, una vez seleccionada la ecuación a utilizar y calculados los parámetros de la misma para los dos productos que se desea comparar, dichos parámetros deben compararse estadísticamente. Para esto también existen diversas maneras, siempre pertenecientes a la estadística multivariada (estadístico T^2 de Hotelling, método de regiones de similitud, etcétera), por tratarse de ecuaciones con al menos dos parámetros, que deben ser comparados simultáneamente.

Otras aplicaciones del ensayo de disolución

Correlaciones *in vitro/in vivo*

Este tipo de correlaciones permiten predecir la absorción *in vivo* del principio activo a partir de los resultados obtenidos al realizar perfiles de disolución *in vitro*. De esa forma, se logran reducir costos y acelerar el desarrollo de productos farmacéuticos, además de evitar la realización de estudios de BD/BE en voluntarios humanos.

Establecer la similitud entre dos medicamentos

* Entre productos conteniendo el mismo principio activo, en igual dosis y forma farmacéutica, pero provenientes de distintos laboratorios (es decir, potenciales *equivalentes farmacéuticos*).
* Productos del mismo productor que han sufrido algún cambio posterior a su aprobación: escalado, cambio de composición, de sitio de producción, de equipamiento, etc.

Sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS): bioexenciones o *biowaivers*

De acuerdo al Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) todas las drogas se encuadran en una de cuatro categorías (I, II, III o IV), según sean altamente solubles y altamente permeables, poco solubles y altamente permeables, muy solubles y poco permeables o poco solubles y poco permeables, respectivamente (Figura 4).

En el año 2000 surgió el concepto de "bioexenciones" para denominar a aquellos productos que podrían ser eximidos de realizar los estudios de BE *in vivo*. En su planteo original, las bioexenciones podían ser permitidas para aquellos productos sólidos de liberación inmediata, destinados a ser administrados por vía oral, conteniendo drogas pertenecientes a la clase I del BCS, si se cumplieran los siguientes requisitos: el fármaco no posee estrecho margen terapéutico y es estable en el tracto gastrointestinal, los excipientes no afectan la velocidad ni el grado de absorción, y el producto no ha sido diseñado para su absorción en la cavidad bucal. En esos casos, los perfiles de disolución *in vitro* podrían reemplazar a los estudios de BE *in vivo*.

La justificación de dicha propuesta consiste en que la liberación y disolución del principio activo en el medio acuoso gastrointestinal y su absorción a través de las membranas celulares hacia la circulación sistémica son procesos consecutivos, por lo que si el primero es más lento que el segundo (clases I y II

del BCS), la velocidad total del proceso quedará supeditada a la del primero. Se dice, en ese caso, que la liberación es el factor limitante de la absorción.
Sin embargo, una intensa discusión se ha desarrollado recientemente acerca de la posibilidad de ampliar los criterios de elegibilidad de bioexenciones. En nuestro país, la Disp. 758/2009 establece los criterios para eximir de la realización de estudios de BE a determinados medicamentos sólidos orales de liberación inmediata: en base al BCS y en función de los resultados de ensayos de disolución, son candidatos a bioexenciones aquellos productos conteniendo principios activos considerados de riesgo intermedio (según la clasificación original establecida en la Disp. 3185/99) cuando los mismos pertenecen a las clases I o III del BCS.

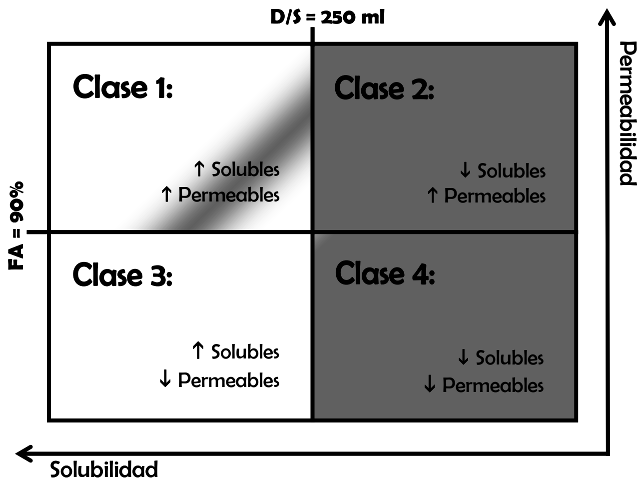


Figura 4. *Representación esquemática del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS). FA: fracción absorbida. D/S: relación dosis/solubilidad*

Preguntas Orientadoras

1. ¿Por qué es importante el estudio de la disolución de los principios activos sólidos?
2. Principal modelo propuesto para explicar el proceso de disolución y ecuaciones derivadas.

3. ¿Logran dichas expresiones describir satisfactoriamente la disolución de medicamentos sólidos?
4. Factores que influyen sobre la velocidad de disolución. Clasificación, breve justificación del efecto de cada uno de ellos.
5. Diferencia entre test y perfil de disolución. Principales objetivos de cada uno.
6. ¿Por qué es importante realizar estos ensayos en forma normatizada, respetando las condiciones codificadas en las farmacopeas?
7. ¿Cuáles son los equipos de disolución que codifica la FA VII Ed? Descríbalos brevemente.
8. Principales métodos que existen para comparar perfiles de disolución. ¿Cuál es el más utilizado? Describa su forma de cálculo y análisis de los resultados.
9. Otras aplicaciones del estudio de la disolución de productos farmacéuticos. ¿Qué entiende por equivalentes farmacéuticos?
10. ¿Qué son las bioexenciones? ¿En qué se basan y cuál es su relación con el ensayo de disolución?

Test de Autoevaluación

1. ¿Qué ensayo de calidad le realizaría a comprimidos para evaluar *in vitro* su biodisponibilidad?
    (a) Ensayo de friabilidad
    (b) Ensayo de uniformidad de dosis
    (c) Ensayo de estabilidad
    (d) Ensayo de disolución

2. El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, clasifica las drogas según:
    (a) Su margen terapéutico
    (b) Sus características de solubilidad y permeabilidad

(c) Su velocidad de disolución
(d) Su acción farmacológica

3. Si un principio activo se considera perteneciente a la clase II del BCS, el factor limitante de su absorción será:
    (a) Su liberación de la forma farmacéutica
    (b) Su solubilidad
    (c) Su permeabilidad a través de las membranas biológicas.
    (d) Todos los anteriores.

4. Si finalizado un ensayo de disolución los resultados obtenidos para los 6 comprimidos fueron 55, 62, 68, 75, 77 y 80 %D, y el valor de Q especificado en la monografía correspondiente era de 75%, ¿qué medidas tomaría ud. a continuación:
    (a) Aprobaría el lote por cumplir con el test de disolución en E1
    (b) Ensayaría 6 comprimidos más para evaluar si cumple la E2 de dicho test
    (c) Ensayaría directamente 18 comprimidos más para evaluar si cumple la E3.
    (d) Descartaría el lote sin realizar más ensayos.

5. Si al comparar los perfiles de disolución de dos productos similares se obtiene que los mismos cumplen con el criterio de similitud del factor f_2 (>50) pero al comparar estadísticamente sus ABC las mismas resultan diferentes, ¿cómo cree ud. que dichos productos resultaría si se ensayan *in vivo*?
    (a) Bioequivalentes
    (b) Equivalentes en términos de cantidad pero no de velocidad
    (c) Equivalentes en términos de velocidad pero no de cantidad
    (d) Ninguna de las anteriores

Bibliografía

1. Shargel L, Yu ABC. (1993) *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. Prentice-Hall International, 3rd ed: London, 625.

2. FDA/CDER. (2003) *Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products - General Considerations.*

3. ANMAT. (1999) *Requerimiento de Estudios de Bioequivalencia, Disposición 3185* (disponible en http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Medicamentos/Disposicion_ANMAT_3185-1999.pdf).

4. EMEA/CPMP. (2001) *Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence.*

5. Cárcamo EC. (1981) *Cinética de Disolución de Medicamentos*. Santiago, Chile.

6. Dokoumetzidis A, Macheras P. (2006) *A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system*. Int J Pharm. 321: 1-11.

7. FDA/CDER. (1997) *Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms*.

8. Arancibia A, Pezoa R, (1992) Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas. *Biodisponibilidad de medicamentos: Simposio Internacional I*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, Santiago de Chile, 309 p.

9. FDA/CDER. (2000) *Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System*.

10. Sathe PM, Tsong Y, Shah VP. (1996) *In-vitro dissolution profile comparison: statistics and analysis, model dependent approach*. Pharm Res. 13: 1799-1803.

11. O'Hara T, Dunne A, Butler J, Devane J. (1998) *A review of methods used to compare dissolution profile data.* Pharmaceutical Science & Technology Today 1: 214-223.

12. Saranadasa H. (2001) *Defining similarity of dissolution profiles through Hotteling's T2 statistic.* Pharm Technol. 25: 46-54.

13. Costa P, Sousa Lobo JM. (2001) *Modeling and comparison of dissolution profiles.* Eur J Pharm Sci. 13: 123-133.

14 Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Plá Delfina JM. (1997) *Biofarmacia y farmacocinética. Vol. 1, Farmacocinética*. Síntesis, Madrid, 446p.

15. Amidon GL. Lennernas H, Shah VP, Crison JR. (1995) *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability.* Pharm Res. 12: 413-420.

CAPITULO 11

UNIFORMIDAD DE UNIDADES DE DOSIFICACIÓN

Susana Mabel Gómez

Introducción

El ensayo de uniformidad de unidades de dosificación, es uno de las pruebas que garantiza la calidad de un producto terminado. Permite verificar que cada unidad de dosificación de un lote en estudio, contenga una cantidad de principio activo dentro de un intervalo estrecho alrededor de la cantidad declarada, y así, inferir la homogeneidad del mismo. Se entiende como “unidades de dosificación” las formas farmacéuticas que contienen una única dosis o parte de una dosis de un fármaco en cada unidad.

Métodos de Uniformidad de Unidades de Dosificación

La uniformidad de las unidades de dosificación se puede demostrar mediante uno de los siguientes métodos:

- *Uniformidad de peso*
- *Uniformidad de contenido*

Para la realización de ambos métodos, se seleccionan 30 unidades de dosificación y en una primera etapa se ensayan 10.

En el método de *uniformidad de peso*, a partir del resultado obtenido en el ensayo de valoración, en el cual se ha utilizado un método analítico validado y apropiado, y el peso individual de las unidades ensayadas, se calculan los contenidos en cada una de las mismas.

En el método de *uniformidad de contenido*, se valoran individualmente las unidades de dosificación, utilizando un método analítico validado y apropiado.

Los criterios a tener en cuenta para aplicar el método de *uniformidad de peso*, varían de acuerdo a la Farmacopea que se considere. El método de

uniformidad de contenido puede aplicarse en todos los casos. En cada método, los criterios de aceptación dependen de la farmacopea que se tome como referencia. A continuación se describen los métodos y sus correspondientes criterios de aceptación, de acuerdo a Farmacopea Argentina VII Ed. y Farmacopea de Estados Unidos (USP 35).

1. *Farmacopea Argentina VII Ed.*

Método Uniformidad de peso: este método puede aplicarse cuando el producto a ensayar contiene 50 mg o más de un principio activo, el cual corresponde al 50 % o más del peso de la unidad.

Para determinar la uniformidad de unidades de dosificación mediante este método, se deben seleccionar no menos de 30 unidades. El procedimiento varía según la forma farmacéutica del lote en estudio.

- *Comprimidos y Comprimidos con cubierta fílmica:* Se pesan exactamente y en forma individual diez comprimidos. A partir del resultado de la valoración obtenido según se indica en la monografía correspondiente se calcula el contenido de principio activo en cada uno de los diez comprimidos, asumiendo que dicho principio activo está uniformemente distribuido.
- *Cápsulas rígidas:* Se pesan exactamente y en forma individual diez cápsulas rígidas intactas, teniendo cuidado de conservar la identidad de cada unidad. Se vacía el contenido de cada cápsula. Se pesan exactamente las cápsulas vacías individualmente y se calcula para cada cápsula el peso de su contenido, restando al peso original de la misma el peso de la cápsula vacía. Se calcula el contenido de principio activo en cada una de las diez cápsulas, empleando el resultado de la valoración obtenido según se indica en la monografía correspondiente, asumiendo que dicho principio activo está uniformemente distribuido.
- *Cápsulas blandas:* Se pesan exactamente y en forma individual diez cápsulas intactas para obtener el peso original de cada una, teniendo cuidado de conservar la identidad de cada cápsula. Se corta las cápsulas y se extrae el contenido mediante el lavado con un solvente

apropiado. Se deja que el solvente ocluido en las cápsulas se evapore a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos; evitando absorción o pérdida de humedad. Se pesan exactamente y en forma individual las cápsulas vacías. Se calcula el contenido neto de cada cápsula, restando al peso original el peso de cada unidad vacía. Se calcula el contenido de principio activo en cada una de las diez cápsulas, empleando el resultado de la valoración obtenido según se indica en la monografía correspondiente, asumiendo que dicho principio activo está uniformemente distribuido.

- *Sólidos (incluyendo sólidos estériles):* se procede de la misma forma que para cápsulas rígidas.
- *Soluciones orales y jarabes:* se procede de la misma forma que para cápsulas rígidas.
- *Soluciones orales y jarabes* – Se pesa exactamente y en forma individual la cantidad de líquido que drena en no más de 5 segundos de diez unidades. Si fuera necesario, tener en cuenta el volumen equivalente después de determinar la densidad aparente. Se calcula el contenido de principio activo en cada una de las diez unidades, empleando el resultado de la valoración obtenido según se indica en la monografía correspondiente.

Método Uniformidad de contenido: este método debe aplicarse cuando las unidades de dosificación contienen el principio activo en una proporción menor a la mencionada en el método de *Uniformidad de peso.* Es decir, productos que no cumplen con alguna de las dos condiciones exigidas para *Uniformidad de peso y*, en todos los casos, para comprimidos recubiertos (excepto cubierta fílmica), sistemas transdérmicos, suspensiones en envases unitarios o en cápsulas blandas, aerosoles dosificadores y supositorios.

Para determinar la uniformidad de unidades de dosificación mediante este método, se deben seleccionar no menos de treinta unidades. El procedimiento consiste en valorar diez unidades individualmente según se indica en la

valoración, a menos que se especifique de otro modo en el *Procedimiento para uniformidad de contenido* en la monografía correspondiente.
Cuando se especifique un *Procedimiento especial para uniformidad de contenido* en la monografía correspondiente, se deben hacer las correcciones necesarias de los resultados obtenidos.

Criterios de aceptación:
Se aplican estos criterios, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.
Criterio A: Si el promedio de los límites especificados en la definición de potencia (Xp) de cada producto en la monografía correspondiente (especificación para el ensayo de valoración) es 100,0 % o menos. $Xp \leq 100$.
Comprimidos, comprimidos recubiertos, comprimidos con cubierta fílmica, supositorios, suspensiones, soluciones orales y jarabes, sólidos y sólidos estériles para uso parenteral: a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos para la uniformidad se cumplen si la cantidad de principio activo en cada una de las diez unidades de dosificación (x_i) determinada empleando el método de Uniformidad de peso o Uniformidad de contenido se encuentra dentro del intervalo de 85,0 a 115,0% del valor declarado y la desviación estándar relativa es menor o igual a 6,0%.

$$85,0\%\ SVD < x_i < 115,0\%\ SVD \ \ y\ CV \leq 6\%$$

Si una unidad está fuera de dicho intervalo y ninguna unidad está fuera de 75,0 a 125,0% del valor declarado, si la desviación estándar relativa es mayor a 6.0% o si ambas condiciones prevalecen, ensayar veinte unidades adicionales. Los requisitos se cumplen si no más de una unidad de las treinta unidades de dosificación está fuera del intervalo de 85,0 a 115,0% del valor declarado, ninguna unidad está fuera del intervalo de 75,0 a 125,0% del valor declarado y la desviación estándar relativa no es mayor a 7.8%.

$$75,0\%\ SVD < x_i < 125,0\%\ SVD \ \ y\ CV \leq 7,8\%$$

Cápsulas, sistemas transdérmicos y soluciones para inhalación: a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos para la uniformidad se cumplen si la cantidad de principio activo en no menos

de nueve de las diez unidades de dosificación determinada empleando el método de *Uniformidad de peso* o *Uniformidad de contenido* se encuentra dentro del intervalo de 85,0 a 115,0 % del valor declarado, ninguna unidad está fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado y la desviación estándar relativa es menor o igual a 6,0 %.

Si dos o tres unidades de dosificación están fuera del intervalo de 85,0 a 115,0 % del valor declarado, pero no fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado, si la desviación estándar relativa es mayor a 6,0 % o si ambas condiciones prevalecen, ensayar veinte unidades adicionales. Los requisitos se cumplen si no más de tres unidades de las treinta unidades de dosificación están fuera del intervalo de, 85,0 a 115,0 % del valor declarado, ninguna unidad está fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado y la desviación estándar relativa no es mayor a 7,8 %.

Aerosoles dosificadores: a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos para la uniformidad se cumplen si la cantidad de principio activo liberado en no más de una de las diez unidades de dosificación, determinada según el método de *Uniformidad de contenido* cae fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado y ninguna unidad está fuera del intervalo de 65,0 a 135,0 % del valor declarado. Si dos o tres unidades de dosificación se encuentran fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado, pero no fuera del intervalo de 65,0 a 135,0 % del valor declarado, ensayar veinte unidades adicionales. Los requisitos se cumplen si no más de tres unidades de las treinta unidades de dosificación están fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado y ninguna unidad está fuera del intervalo de 65,0 a 135,0 % del valor declarado.

NOTA: una unidad de dosificación se define como el líquido obtenido accionando la válvula, tantas veces como se indique en el rótulo, para obtener la dosis recomendada. Seguir las indicaciones de uso indicadas en el rótulo. Para la obtención de la unidad de dosificación del inhalador, proceder según se indica en el ensayo para *Uniformidad de contenido de la dosis* en *<390>. Ensayos farmacéuticos para aerosoles*

Criterio B: Si el promedio de los límites especificados en la definición de potencia de cada producto (*Xp*) en la monografía correspondiente (especificación para el ensayo de valoración) es mayor de 100,0 %. *Xp > 100*
Debemos considerar las siguientes tres opciones, a saber:
(1) Si el valor del promedio de las unidades de dosificación ensayadas *(X)* es 100 o menos, $X \leq 100$, *l*os requisitos son como en A). Este criterio no es de Farmacopea pero es de uso habitual.
(2) Si el valor del promedio de las unidades de dosificación ensayadas (X) es mayor o igual al promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía correspondiente (*Xp)*, $X \geq Xp$, los requisitos son los descriptos en *(A)*, excepto que las palabras *valor declarado* se reemplazan por las palabras *"valor declarado multiplicado por el promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía correspondiente dividido 100"*. Los intervalos resultantes son:

[85,0 . Xp/100 - 115.0 . Xp/100]

[75,0 . Xp/100 - 125.0 . Xp/100]

(3) Si el valor promedio de las unidades de dosificación ensayadas *(X)* está entre 100 % y el promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía correspondiente *(Xp)*, $100 < X < Xp$, los requisitos son los descriptos en *(A)*, excepto que las palabras *valor declarado* se reemplazan por las palabras "*valor declarado multiplicado por el valor promedio de las unidades de dosificación ensayadas (expresado como porcentaje del valor declarado) dividido 100"*. Los intervalos resultantes son:

[85,0 . X/100 - 115,0 . X/100]

[75,0 . X/100 - 125,0 . X/100]

2. Farmacopea de Estados Unidos -USP 35 (armonizado con los textos de Farmacopea Europea y Farmacopea Japonesa).

Método Uniformidad de peso: este método puede aplicarse para las siguientes formas farmacéuticas:

- Soluciones contenidas en envases de dosis única y en cápsulas blandas

- Sólidos (incluidos los polvos, gránulos y sólidos estériles) envasados en envases unitarios y que no contengan sustancias activas o inactivas agregadas.
- Sólidos (incluidos los estériles) envasados en envases unitarios, con o sin sustancias activas o inactivas agregadas, que hayan sido preparados por liofilización a partir de soluciones verdaderas en sus envases finales y que declaran este método de preparación
- Cápsulas duras, tabletas sin cubierta o tabletas recubiertas con películas que contengan 25 mg o más de un fármaco que corresponda al 25% o más, en peso, de la unidad de dosificación o, en el caso de cápsulas duras, el contenido de las cápsulas, excepto que se demuestre la uniformidad de otros fármacos presentes en proporciones menores en cumplimiento de los requisitos de uniformidad de contenido.

En este método la valoración del/los principio/s activo/s se realiza, en una muestra representativa del lote en estudio utilizando un método analítico apropiado. El resultado se expresa en porcentaje de la cantidad declarada. Se asume que la concentración del principio activo en la unidad de dosificación es uniforme. Se seleccionan no menos de 30 unidades de dosificación. El procedimiento varía según la forma farmacéutica, a saber:

Tabletas sin cubierta o recubiertas con película: se pesan con exactitud 10 unidades individualmente. Se calcula el contenido, expresado como porcentaje de la cantidad declarada, a partir del peso de la tableta individual y del resultado de la valoración. Se calcula el valor de aceptación.

Cápsulas duras: se pesan con exactitud 10 unidades individualmente, teniendo cuidado de preservar la identidad de cada una de ellas. Se retira el contenido de cada cápsula por un medio adecuado. Se pesan individualmente con exactitud las cubiertas vacías y se calcula para cada cápsula, el peso neto de su contenido. Luego, el contenido de principio activo de cada cápsula a partir del peso neto del contenido de la cápsula individual y del resultado de la valoración, y por último, el valor de aceptación.

Cápsulas blandas: se pesan con exactitud 10 cápsulas intactas individualmente, teniendo cuidado de preservar la identidad de cada una de

ellas. Se cortan y abren las mismas con ayuda de un elemento cortante seco, limpio y adecuado y se retira el contenido lavando con un disolvente adecuado. Se espera que el disolvente ocluido se evapore de las cubiertas a temperatura ambiente por 30 minutos aproximadamente. Se pesan las cubiertas y se calcula el contenido neto. Luego, el contenido de principio activo en cada cápsula a partir del peso neto del contenido de la cápsula individual y del resultado de la valoración, y por último, el valor de aceptación.

Formas farmacéuticas sólidas diferentes de tabletas y cápsulas: se procede del mismo modo que para cápsulas duras.

Formas farmacéuticas líquidas: se pesan con exactitud la cantidad de líquido que se retira de cada uno de 10 envases individuales en condiciones normales de uso. Se calcula el contenido de principio activo en cada envase a partir de la masa de producto retirada de los envases individuales y del resultado de la valoración, y luego, el valor de aceptación.

Método Uniformidad de contenido

Se seleccionan no menos de 30 unidades y se procede según la forma farmacéutica, a saber:

Formas farmacéuticas sólidas: se valoran 10 unidades individualmente usando un método analítico apropiado. Se calcula el valor de aceptación.

Formas farmacéuticas líquidas o semisólidas: se valoran 10 unidades individualmente usando un método analítico apropiado. Se realiza la valoración sobre la cantidad de material bien mezclado que se retira de un envase individual en condiciones normales de uso y se expresan los resultados como la dosis entregada. Se calcula el valor de aceptación.

Cálculo del valor de aceptación:

El valor de aceptación *(VA)* se calcula a partir de la siguiente ecuación

$$VA= /M - X/ + ks \quad (Ec.\ 1)$$

M: valor de referencia que toma distintos valores (ver más adelante)

X: media de los contenidos individuales, expresados como *Porcentaje Sobre Valor Declarado (%SVD)*

k: constante de aceptabilidad. Toma distintos valores según la cantidad de unidades ensayadas.

si n=10, k=2,4

si n=30, k=2,0

n: número de unidades ensayadas

s: desviación estándard de la muestra.

Caso 1: Se aplica cuando T es ≤ 101,5% .

(a) Si 98,5% ≤ X ≤ 101,5%   M = X y VA = k s

(b) Si X < 98,5%   M = 98,5% y VA = /98,5 - X / + k s

(c) Si X > 101,5%   M = 101,5% y VA = /X – 101,5 / + k s

Caso 2: Se aplica cuando T es > 101,5%

(a) Si 98,5% ≤ X ≤ T   M = X y VA = k s

(b) Si X < 98,5%   M = 98,5% y VA = /98,5 - X / + k s

(c) Si X > T   M = T y VA = /X – T / + k s

Donde T corresponde al contenido deseado por unidad de dosificación al momento de la fabricación, expresado como porcentaje de la cantidad declarada. A menos que se indique de otro modo, T es 100% o es el contenido deseado aprobado por el fabricante por unidad de dosificación.

Criterios de aceptación

Se cumple el ensayo de uniformidad de unidades de dosificación si:

- El valor de aceptación de las primeras 10 unidades ensayadas es menor o igual a $L_{1\%}$. (primera etapa)

Si es mayor, se deben analizar 20 unidades más y calcular el nuevo valor de aceptación Se cumple con los requisitos si:

- El valor de aceptación de las 30 unidades es menor o igual que L_1, y
- El contenido individual de principio activo de cada una de las unidades de dosificación está dentro del intervalo *[1 + (0,01.L_2)]M* (segunda etapa) donde L_1*=15 y* L_2*=25*

Preguntas Orientadoras

1. Indique el objetivo del ensayo de Uniformidad de Unidades de Dosificación
2. describa los métodos mediante los cuales se puede verificar la Uniformidad de Unidades de Dosificación
3. Indique los criterios en los que se basa la aplicación de los métodos descriptos en la pregunta anterior
4. En qué se basan los criterios de aceptación del Ensayo de Uniformidad de Unidades de Dosificación de Farmacopea Argentina VII Ed
5. Cómo se calcula el valor de aceptación según USP 35 y cuáles son los criterios de aceptación?

Test de Autoevaluación

1. El ensayo de uniformidad de unidades de dosificación es una prueba de calidad para:
    a) materia prima
    b) producto terminado
    c) materia prima y producto terminado
2. El ensayo de Uniformidad de Unidades de Dosificación permite:
    a) verificar que cada unidad de dosificación de un lote en estudio, contenga una cantidad de principio activo dentro de un intervalo estrecho alrededor de la cantidad declarada
    b) inferir la homogeneidad de cada unidad de dosificación de un lote
    c) verificar que cada unidad de dosificación de un lote en estudio, contenga una cantidad de principio activo dentro de un intervalo estrecho alrededor de la cantidad declarada y así inferir la homogeneidad del mismo

3. El ensayo de Uniformidad de Unidades de Dosificación se puede demostrar mediante:
    a) El método de *uniformidad de peso o de contenido*, según corresponda
    b) El ensayo de disolución
    c) El método de los ceros cruzados

4. Los contenidos de principio activo en las unidades de dosificación ensayadas, se calculan valorando individualmente cada una de ellas en
    a) el método de uniformidad de peso
    b) el método de uniformidad de contenido
    c) en ambos métodos

5. El método de *Uniformidad de peso* puede aplicarse cuando el producto a ensayar contiene 50 mg o más de un principio activo el cual corresponde al 50 % o más del peso de la unidad
    a) según USP 35
    b) según FA VII Ed
    c) según Farmacopea Japonesa

6. El método de Uniformidad de peso puede aplicarse cuando el producto a ensayar contiene 25 mg o más de un principio activo el cual corresponde al 25 % o más del peso de la unidad
    a) según USP 35
    b) según FA VII Ed
    c) según Farmacopea Japonesa

7. Según FA VII Ed, si el promedio de los límites especificados en la definición de potencia de cada producto en la monografía correspondiente es 100,0 % o menos, se aplica:
    a) Criterio A

b) Criterio B
c) Criterio C

8. Según FA VII Ed Si el promedio de los límites especificados en la definición de potencia de cada producto en la monografía correspondiente es mayor de 100,0 %, se aplica:
    a) Criterio A
    b) Criterio B
    c) Criterio C

9. Según USP 35, el criterio de aceptación para las primeras 10 unidades ensayadas exige que
    a) $VA \leq L_{1\%}$
    b) $VA > L_{1\%}$
    c) $VA \leq L_{2\%}$
    d) $VA \leq L_{2\%}$

10. Según USP 35, el criterio de aceptación para la segunda etapa, exige que
    a) $VA \leq L_{2\%}$
    b) $VA > L_{1\%}$
    c) $VA \leq L_{1\%}$ y el contenido individual de principio activo de cada una de las unidades de dosificación esté dentro del intervalo $[1 \pm (0{,}01.L_2)]M$

Bibliografía

1. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VII ed. (2003) Buenos Aires.

2. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 35) (2011) Rockville.

CAPITULO 12

ESTABILIDAD DE DROGAS Y MEDICAMENTOS

María Guillermina Volonté

Introducción

Qué se entiende por estabilidad en términos generales? Es la cualidad de mantenerse sin peligro de cambiar, caer o desaparecer.

Por ello, cuando hablamos de medicamentos podremos decir que estabilidad es el grado en el que un medicamento retiene, dentro de límites especificados y durante todo su período de almacenamiento y utilización, las mismas propiedades y características que poseía en el momento de la preparación

Y cuál será, entonces, el objetivo de un estudio de estabilidad?

El propósito general de los estudios de estabilidad es proveer evidencia de cómo la calidad de una materia prima o un medicamento varía con el tiempo bajo la influencia de factores de naturaleza ambiental tales como temperatura, humedad, luz, gases atmosféricos y factores relacionados con el medicamento en sí, como ser los componentes de la formulación y su envase.

Los Estudios de Estabilidad son necesarios para asegurar que una materia prima o una formulación mantenga su integridad, identidad, potencia, calidad y pureza, frente a dichos factores, durante el período de vida útil asignado.

Básicamente los objetivos de los estudios de estabilidad son dos:

- Seleccionar las condiciones óptimas de almacenamiento de la materia prima o del medicamento.
- Establecer la fecha de reanálisis (en el caso de las materias primas) y la fecha de vencimiento (en el caso de los medicamentos).

Cómo podemos definir Fecha de Vencimiento? Será la fecha proporcionada por el elaborador, basada en los estudios de estabilidad del producto farmacéutico, después de la cual el mismo no debe emplearse. El producto debe cumplir durante este período con las especificaciones dadas en Farmacopea Argentina. (FA VII ed.)

Es decir, será la fecha en la que se considera terminado el período de vida útil de las materias primas o los medicamentos, no pudiendo asegurarse de allí en más que una u otra mantengan las características de eficacia (potencia, biodisponibilidad) y seguridad originales, así como tampoco sus propiedades físicas o sus características organolépticas.
Qué tipos de estabilidad podemos definir?

Tipo de estabilidad	Condiciones que debe mantener el producto a lo largo de la vida útil
Química	Cada ingrediente activo retiene su identidad química y la potencia indicada, dentro de los límites de las especificaciones.
Física	Se mantienen las propiedades físicas indicadas originalmente, incluyendo apariencia, palatabilidad, uniformidad y disolución.
Microbiológica	Son retenidas, según corresponda, la esterilidad o la resistencia al crecimiento microbiano. Los agentes antimicrobianos presentes retienen su efectividad.
Terapéutica	El efecto terapeútico permanece invariante.
Toxicológica	No hay incremento significativo en la toxicidad.

Tabla 1. *Tipos y condiciones de estabilidad*

En los estudios de estabilidad la materia prima o la formulación se colocan en un envase adecuado (el envase en el cual serán comercializadas) y son almacenadas bajo condiciones normales y extremas. A intervalos adecuados se ensaya la potencia del producto mediante un método indicativo de estabilidad, validado y se observa si han aparecido cambios físicos. Cuando corresponde, concluido el tiempo que dura el estudio de estabilidad, deben ensayarse asimismo la esterilidad, la resistencia al crecimiento microbiano, la toxicidad y la biodisponibilidad (por lo general se acepta que si el medicamento cumple con el test de disolución la biodisponibilidad se ha mantenido).
Cabe mencionar que las condiciones en que se llevan a cabo los estudios de estabilidad dependen de la región climática en la que la materia prima o el

medicamento serán utilizados. Se considera que el mundo se encuentra dividido en cuatro zonas climáticas, que se especifican en la tabla siguiente, perteneciendo la Argentina a la Zona II.

Zona climática	Definición	Condiciones de almacenamiento
I	Clima templado	21 ˚C – 45 % humedad relativa
II	*Clima subtropical y mediterráneo*	*25 ˚C – 60 % humedad relativa*
III	Clima cálido y seco	30 ˚C – 35 % humedad relativa
IV	Clima cálido y húmedo	30 ˚C – 45 % humedad relativa

Tabla 2. *Zonas climáticas y condiciones de almacenamiento*

A continuación se presentan las definiciones de la terminología utilizada habitualmente para referir las condiciones en las que debe almacenarse una droga o un medicamento.

- Freezer: cualquier temperatura mantenida termostáticamente entre -25 **y** -10˚C.
- Frío: cualquier temperatura que no exceda los 8˚C.
- Heladera o refrigerador: se refiere a un lugar en el que la temperatura se mantiene termostáticamente entre los 2 y los 8˚C.
- Fresco: cualquier temperatura entre 8 y 15˚C.
- Temperatura ambiente: es la temperatura del área de trabajo.
- Temperatura ambiente controlada: es la temperatura mantenida termostáticamente entre los 20 y los 25˚C.
- Cálido: cualquier temperatura entre los 30 y los 40˚C.

Tipos de estudios de estabilidad

- *Estudios de degradación forzada*: Sirven para establecer posibles rutas de degradación de la molécula de principio activo y los productos de degradación más probables. Esto reviste especial importancia, ya que es necesario conocer los productos de degradación para validar el método

analítico utilizado. Pueden realizarse sobre un único lote de materia prima o producto terminado, y utilizar condiciones más drásticas que las empleadas en un estudio de estabilidad acelerado (por ej. temperaturas más altas).

- *Estudios de estabilidad acelerados*: Diseñados para aumentar la velocidad de degradación química y la velocidad de cambio en las propiedades físicas de una sustancia o producto, empleando condiciones de almacenamiento extremas. El estudio de estabilidad acelerado es optativo, excepto cuando se desee realizar la presentación del producto medicamentoso ante la autoridad sanitaria previamente a la finalización del estudio de estabilidad a largo plazo. En este caso los resultados provisorios del estudio de estabilidad a largo plazo deben acompañarse de por lo menos seis meses de estudio acelerado. Se requiere la evaluación de las características de la materia prima o producto por lo menos a tres tiempos distintos. Si en la determinación del tercer tiempo se observa un cambio significativo inminente, debe determinarse un cuarto tiempo. Si el estudio de estabilidad acelerado da lugar a un cambio significativo, debe procederse a realizar un estudio de estabilidad intermedio. Se considera cambio significativo a la pérdida de 5 % de potencia; aparición de cualquier producto de degradación que exceda los límites establecidos; valores de pH fuera de los límites especificados; resultado del ensayo de disolución fuera de los límites especificados; incumplimiento por parte del producto de las características de apariencia y propiedades físicas tales como color, separación de fases, etc.

  El estudio de estabilidad acelerado se emplea para:

- Determinar los parámetros cinéticos de los procesos de degradación.
- Predecir la vida útil del producto farmacéutico en condiciones normales de almacenamiento.
- Evaluar el impacto de desviaciones de corta duración con respecto a las condiciones declaradas en el rótulo, como suele ocurrir durante el transporte y distribución.

En la tabla siguiente se incluyen las condiciones de los diferentes estudios de estabilidad acelerados según la materia prima o el medicamento estén

destinados para almacenaje a temperatura ambiente controlada (25˚C), en heladera o en freezer:

Almacenaje	Temperatura	Humedad relativa	Tiempo
Temperatura ambiente controlada	40ºC ± 2 ºC	75% ± 5%	6 meses
Heladera	25ºC ± 2 ºC	60% ± 5%	6 meses
Freezer	5ºC ± 3 ºC	-	6 meses

Tabla 3. *Condiciones de los estudios de estabilidad*

- *Estudios de estabilidad intermedios*: Se realizan en el caso de que el estudio de estabilidad acelerado dé lugar a un cambio significativo. Los estudios de estabilidad intermedios deben abarcar, como mínimo, doce meses y exigen por lo menos cuatro determinaciones en el tiempo. Cuando la materia prima o el medicamento se destine a almacenaje a 25ºC, las condiciones especificadas para el estudio de estabilidad intermedio serán de 30ºC ± 2ºC, 60% ± 5% HR. Junto a los estudios de estabilidad acelerados, permiten establecer el impacto de desviaciones de corta duración en las condiciones ambientales con respecto a las condiciones declaradas en el rótulo.

- *Estudios de estabilidad a largo plazo, natural, en tiempo real o estudios de estabilidad en estantería*: La duración de este estudio y las condiciones de almacenamiento deben ser suficientes para cubrir la distribución, almacenamiento y período de uso subsiguiente. En el caso de productos que deben ser reconstituidos se deben establecer las condiciones de almacenamiento y las correspondientes fechas de vencimiento para el producto antes y después de ser reconstituido. La frecuencia de determinaciones en los estudios a largo plazo será -como mínimo- la siguiente: cada tres meses en el primer año, cada seis meses en el segundo año y cada doce meses luego del segundo año. Para la

aprobación del producto medicamentoso para su comercialización, el estudio de estabilidad deberá tener, como mínimo, en el momento de presentación, doce meses de estabilidad natural y seis meses de estabilidad acelerada, de lo contrario el producto no podrá ser presentado ante las autoridades sanitarias para su evaluación. Mientras que los estudios de estabilidad acelerados e intermedios son de carácter optativo, el estudio de larga duración es obligatorio. El laboratorio fabricante asume a su vez el compromiso de completar los estudios necesarios de acuerdo al protocolo aprobado, evaluar la estabilidad de al menos un lote anual y retirar del mercado todo lote de producto que no cumpla con las especificaciones. Este compromiso recibe el nombre de *Compromiso de Estabilidad*.

A continuación se presenta la tabla con las condiciones de temperatura y humedad relativa utilizadas en el estudio de estabilidad a largo plazo según se trate de un producto destinado a almacenaje a 25ºC, heladera o freezer.

Almacenaje	Temperatura	Humedad relativa	Tiempo
25ºC	25ºC ± 2ºC	60% ± 5%	12 meses
Heladera	5ºC ± 3ºC	-	12 meses
Freezer	-20ºC ± 5ºC	-	12 meses

Tabla 4. *Condiciones para estudios de estabilidad a largo plazo*

Protocolo de estabilidad

Deben considerarse:

- *Tipo, tamaño, número de lotes, orientación del envase y cierre*: los estudios de estabilidad a largo plazo deben llevarse a cabo por lo menos en tres lotes de igual formulación, proceso de elaboración y envase. Dichos lotes deben estar elaborados en planta piloto que simule la planta de producción.
- *Plan de muestreo:* se refiere a los tiempos de muestreo, ya indicados para cada estudio.

- *Especificaciones*: Los límites de aceptabilidad deberían derivarse de los estudios preclínicos y los ensayos clínicos. Las especificaciones deben incluir límites superiores individuales y totales para impurezas y sustancias relacionadas. Habitualmente se utilizan las especificaciones que figuran en las farmacopeas.
- *Aplicación de un método analítico adecuado y obtención de resultados del estudio*. Se desarrolla a continuación.
- *Evaluación estadística de los datos obtenidos durante el estudio*. Idem.
- *Establecimiento de la fecha de reanálisis y fecha de vencimiento*. Idem.
- *Compromiso de estabilidad*: asumido por el laboratorio elaborador, como ya se indicó.

Características que debe reunir el método analítico

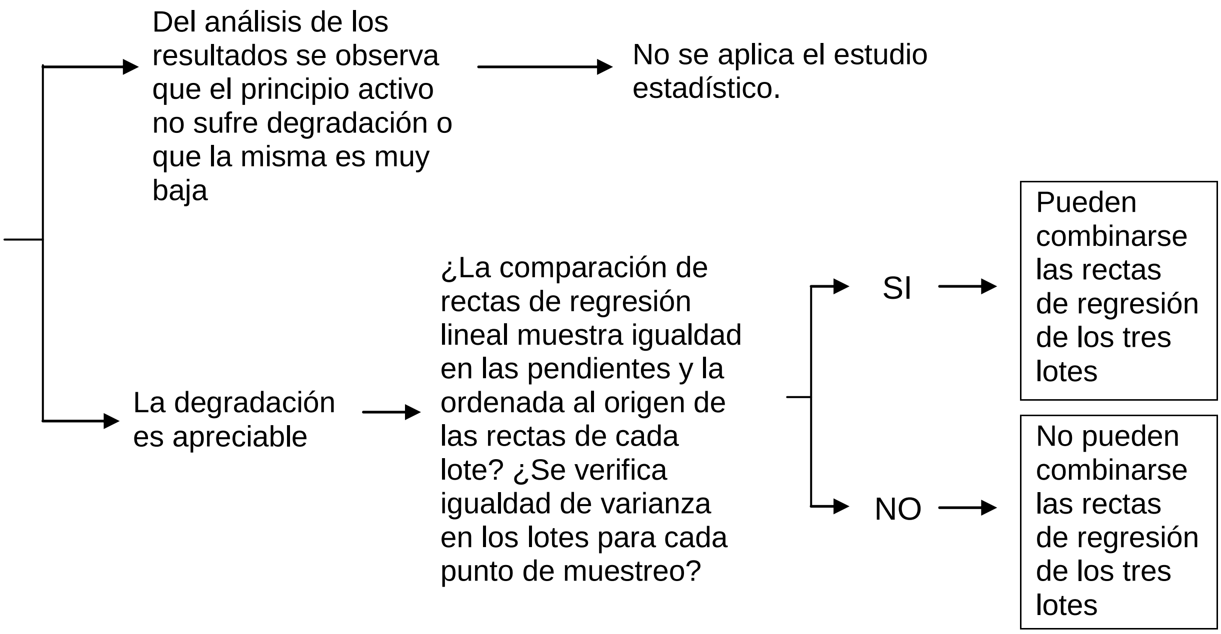
Un método analítico indicativo de estabilidad es aquel que permite cuantificar con exactitud y precisión el o los principios activos intactos en presencia de sus productos de degradación, impurezas de síntesis y –en el caso de un producto medicamentoso– de otros componentes de la formulación. De ahí que sea fundamental la validación del método analítico para que sea considerado método indicativo de estabilidad.

Entre los parámetros que hay que determinar es de suma importancia, sobre todo en este caso, la especificidad que, si recordamos, se define como la capacidad de determinar un analito en presencia de compuestos que son esperables de encontrar en la muestra analizada, es así que se comprenderá que la especificidad es un requisito fundamental de cualquier método indicativo de estabilidad.

Los métodos más utilizados son los separativos, como los cromatográficos, HPLC, GC, TLC, y Electroforesis capilar.

Evaluación estadística de los datos obtenidos durante el estudio y establecimiento de la fecha de vencimiento

Si el análisis estadístico de los tres lotes utilizados muestra que la variabilidad lote a lote es pequeña, resultará ventajoso combinar los datos de los tres lotes en una única estimación total. A continuación se presenta un árbol de decisiones en el que se indica si la combinación de los resultados obtenidos es o no posible.



En el caso de que el análisis estadístico indique que la información dada por los tres lotes no puede combinarse, la vida útil deberá determinarse a partir del lote que se haya mantenido dentro de las especificaciones durante el menor tiempo.

Según las guías internacionales (ICH, FDA, WHO, USP) y según la Farmacopea Argentina, una aproximación aceptable para los atributos cuantificables que disminuyen con el tiempo (como por ejemplo cantidad de principio activo intacto) consiste en determinar el tiempo al cual el límite inferior del intervalo de confianza (p=95%) para la curva media de degradación se intercepta con el límite inferior del intervalo de aceptación.

Se utiliza el límite inferior del IC como modo de extremar las precauciones y garantizar la eficacia y seguridad del medicamento.

Si se tratara de una propiedad cuantificable que aumenta con el tiempo (como ser, por ejemplo, cantidad presente de una determinada sustancia relacionada o de un producto de degradación) la situación se invierte y se determina el tiempo para el cual el límite de aceptación se intercepta con el límite superior del intervalo de confianza (p=95%).

Es importante considerar que cualquier evaluación de la estabilidad de una droga o un medicamento debería cubrir no sólo el contenido de principio activo, sino también los niveles de sustancias relacionadas y otros atributos apropiados, como velocidad de disolución, % de impurezas, etc.

En ese marco, debe hacerse notar que la fecha de vencimiento de un medicamento está dada por el menor tiempo en el cual deja de cumplirse alguna de esas especificaciones (cantidad de principio activo intacto, cantidad total de sustancias relacionadas, cantidad de una sustancia relacionada en particular, velocidad de disolución, etc.). A modo de ejemplo, supongamos que las especificaciones de un medicamento determinado indican que la cantidad de principio activo del mismo debe estar entre el 90 y 110 % del valor declarado y que la cantidad de sustancia relacionada X no debe ser mayor al 1% del valor declarado de principio activo. Si los estudios de estabilidad indicaran que el principio activo alcanza el 90% del valor declarado en cuatro años y que en cambio la sustancia relacionada X sobrepasa el 1% especificado en tan sólo dos años, se elegirá como fecha de vencimiento no cuatro, sino dos años a partir de la fecha de elaboración del medicamento.

Factores que afectan la estabilidad

En general, podemos clasificarlos en :

- Factores que dependen de las condiciones de almacenamiento: como ser Temperatura, Luz, Gases atmosféricos, Humedad
- Factores que dependen de la interacción con el envase y con excipientes.

Respecto a los primeros, los factores ambientales que pueden afectar a las drogas y a los medicamentos son:

- **Temperatura:** las altas temperaturas pueden acelerar la velocidad de las reacciones degradativas y, en el caso de formulaciones líquidas, aumentar la evaporación de disolventes. Las bajas temperaturas pueden facilitar el deterioro de algunos materiales plásticos.
- **Luz:** este factor es una amenaza para los compuestos fotolábiles. Para evitar esto se utilizan, en los envases primario y secundario, materiales opacos o que bloqueen radiaciones de ciertas longitudes de onda particularmente nocivas (por ejemplo, frascos de color caramelo-inactínicos).

  Gases atmosféricos: Si bien el oxígeno es el que más inconvenientes puede causar, dado que favorece la oxidación de muchas sustancias, el dióxido de carbono también debe ser tomado en cuenta, ya que puede alterar el pH de las soluciones (con la subsecuente precipitación potencial de algún compuesto de características ácido–base) y dar lugar a la formación de carbonatos insolubles. El uso de envases fabricados a partir de materiales impermeables y de cierres herméticos es una buena estrategia para evitar las consecuencias de la exposición a la atmósfera, al mismo tiempo que se minimiza la pérdida de sustancias volátiles presentes en la formulación. En el caso de formas farmacéuticas multidosis sólidas (por ejemplo comprimidos) conviene recurrir a envases con compartimentos separados para cada una de las dosis. En el caso de formas farmacéuticas líquidas (por ejemplo un jarabe) interesa que el cierre mantenga su característica hermética con el uso sucesivo, es decir que siga siendo efectivo al cerrarlo luego de la primera vez de uso.

  Recordemos que una estrategia adicional de naturaleza farmacotécnica es, en el caso de sustancias de alto potencial de oxidación, la inclusión en la formulación de sustancias antioxidantes.
- **Humedad:** el agua, tanto en su forma líquida como en su forma vapor, puede producir daños de tipo físico (tales como ablandamiento de una

cápsula y endurecimiento de un comprimido), como químico (efervescencia, hidrólisis). Una buena estrategia para proteger drogas y medicamentos de la humedad es el uso de envases fabricados en materiales impermeables y con cierres herméticos. Es una práctica común incluir, dentro del envase secundario, alguna sustancia desecante (por ejemplo, sílicagel).

Hay factores que dependen del envase, para comprenderlos se deben tener en cuenta los distintos tipos de envase, funciones, etc.

Envases – Clasificación

Envases

- **Primario:** se define como envase primario a aquel que se encuentra en contacto directo con el medicamento. A modo de ejemplo podemos citar los blisters, frascos y ampollas.
- **Secundario:** se define como el embalaje en el que se encuentra incluido el envase primario.

Funciones del envase

Las principales funciones del envase (entendido como la suma de los envases primario y secundario y el prospecto) son dos, a saber:

- Proporcionar protección frente a agentes externos, tanto los de tipo mecánico (golpes, caídas, presiones) como los de naturaleza ambiental (humedad, temperatura, luz, gases atmosféricos) y biológica (insectos, bacterias, hongos).

- Proporcionar identificación e información necesaria para su adecuada administración y conservación, tanto al paciente como al profesional sanitario. En el prospecto debe incluirse la formulación y los aspectos farmacológicos y toxicológicos, con el objeto de conseguir una administración más segura. El paciente tiene el derecho y la obligación de conocer qué laboratorio ha fabricado el medicamento, su fecha de vencimiento, las contraindicaciones y reacciones adversas, etc. Una buena medida para inducir al paciente a leer el prospecto es la inclusión, en el envase primario o secundario, de una invitación expresa y claramente visible a leer las instrucciones que figuran en el prospecto. Entre las buenas prácticas de atención farmacéutica figura que, al dispensar un medicamento, el profesional farmacéutico no sólo instruya sobre las características más generales que el paciente debe tener en cuenta para garantizar la administración segura, minimizar efectos adversos y favorecer la observación rigurosa del tratamiento, sino también que invite a conocer la información dada por el prospecto y por los envases primario y secundario.

Características del envase primario

El envase primario debería cumplir con las siguientes características:

- No debe reaccionar con ningún componente de la forma farmaceútica.
- No debe ceder ningún componente al medicamento.
- No se debe producir ni adsorción ni absorción de ningún componente del medicamento sobre el mismo.
- No debe afectar negativamente ninguna de las características que hacen a la estabilidad y calidad del medicamento.
- Como mínimo, debe incluir la siguiente información: nombre del medicamento, lote de fabricación, fecha de vencimiento, vía de administración y peso o volumen del medicamento contenido en el envase.

Características del envase secundario

El envase secundario suele estar constituido por una caja de cartón satinada con el fin de mejorar la presentación y dar mayor protección frente a la humedad y la luz. Una de sus principales funciones es proteger al envase primario contra golpes y caídas. También actúa como elemento de identificación externa.

La información que debe contener el envase secundario es:

- Nombre del medicamento y nombre genérico del principio activo
- Composición cuali – cuantitativa.
- Forma farmaceútica y contenido en peso o volumen.
- Vía de administración.
- La advertencia “Manténgase fuera del alcance de los niños”.
- Fecha de vencimiento.
- Precauciones que deben tenerse en cuenta para su adecuada conservación.
- Nombre y dirección del titular de la autorización del medicamento.
- Identificación del lote de fabricación.
- Las leyendas “Venta Libre” o “Venta bajo receta”, según corresponda.

En cuanto a los factores que pueden afectar la estabilidad dependientes de la interacción con excipientes, debemos tener en cuenta que éstos no deben reaccionar entre sí, ni con los principios activos, mediante distintos tipos de reacciones, por ejempl,: formación de complejos, de pares iónicos, transferencia de acilo, etc.

ENVASES PRIMARIOS CLASIFICADOS SEGUN TIPO DE FORMA FARMACEUTICA

FORMAS LIQUIDAS

Ampollas: recipientes de pequeño volumen, elaboradas con vidrio incoloro o color caramelo. El contenido se extrae en una sola vez, previa ruptura. La ampolla debe romperse por el estrangulamiento, limando esa zona con lima metálica o si se dispone de las llamadas ampollas de fácil ruptura, pueden abrirse ejerciendo una pequeña presión con las manos sobre una zona de fragilidad del estrangulamiento, señalada con un punto o una línea de pintura

Viales: recipientes de vidrio incoloro o color caramelo de capacidad variable; el cerrado se efectúa con un tapón de material elastomérico y el sellado con una cápsula de aluminio o aluminio – plástico

Jeringas prellenadas: su interés reside en la nula manipulación del inyectable para ser administrado. Se utiliza para la administración de insulinas, heparinas, etc.

FORMAS SEMISOLIDAS

Tubo de metal: si se utiliza correctamente, el riesgo de contaminación de la fracción remanente es mínimo ya que el tubo, al ser colapsable, no vuelve a inspirar aire hacia el interior una vez que cede la presión de la mano. Si la formulación es incompatible con el metal, el interior se recubre con sustancias céreas o resinas epoxi

Tubo de plástico: inodoro, irrompible, con gran inercia química. Son capaces de mantener su forma durante toda su vida útil, lo cual supone una ventaja estética compensada con una desventaja en lo que respecta a la estabilidad: al recuperar su forma original luego de la administración puede ocurrir la entrada de aire, lo que constituye un riesgo de alteración de la fracción remanente.

FORMAS SOLIDAS

Las formas sólidas de administración oral suelen acondicionarse en envases de tipo **blister**, constituidos por una lámina moldeada en forma de pequeñas cavidades sellada en su parte inferior. La superior puede ser de aluminio o cloruro de polivinilo. La inferior es de aluminio.

Otra forma menos común es envasar las formas sólidas de administración oral entre dos láminas de plástico, papel y aluminio, que mediante termosellado en los bordes alrededor de cada dosis da origen al **envase de tiras**, óptimo para comprimidos efervescentes por la baja permeación a la humedad.

Respondabilidades del farmaceútico respecto a la estabilidad de los medicamentos en la oficina de farmacia

Varias son las acciones mediante las cuales el farmacéutico debe asegurar que los productos bajo su supervisión cumplan los criterios de estabilidad:

- Dispensar siempre el stock más viejo; controlar la fecha de vencimiento de los productos en stock y, también, al momento de dispensarlos.
- Almacenar los productos medicamentosos y las materias primas bajo las condiciones de almacenamiento establecidas por la monografía correspondiente o indicadas en el envase y prospecto. Cuando un producto deba ser almacenado a resguardo de la luz y se encuentre en un envase primario transparente contenido a su vez en un envase secundario opaco, éste último no debe descartarse hasta que se haya terminado de administrar el medicamento. En ausencia de instrucciones específicas en el envase y prospecto, el medicamento o la droga deberían ser almacenados a temperatura ambiente controlada. Se debe evitar almacenar el medicamento o la materia prima en las proximidades de una fuente de calor o luz excesivos o variables, como puede ser, a modo de ejemplo, un tubo fluorescente.
- Observar los medicamentos en busca de evidencias de inestabilidad.
    - *Formas farmacéuticas sólidas:* la aparición de gotas de líquido condensadas dentro del envase es evidencia de condiciones inadecuadas. Algunas drogas como el ácido salicílico pueden sublimar y depositarse en las paredes del envase en forma de cristales. En el caso de las cápsulas el ablandamiento o endurecimiento de la cubierta son los principales indicativos de inestabilidad. Otro signo de inestabilidad lo constituye cualquier evidencia de desprendimiento gaseoso, como ser que parte del envase se encuentre distendida. En el caso de comprimidos, pueden citarse a modo de ejemplos de signos de inestabilidad: decoloración, distintos tipos de erosión y picado, fusión de comprimidos, aparición de cristales en las paredes del envase o sobre los comprimidos. Las cápsulas no deberán mostrar evidencia de

abalandamiento o endurecimiento de la cubierta. Los polvos y granulados no deberán aglomerarse formando partículas grandes.

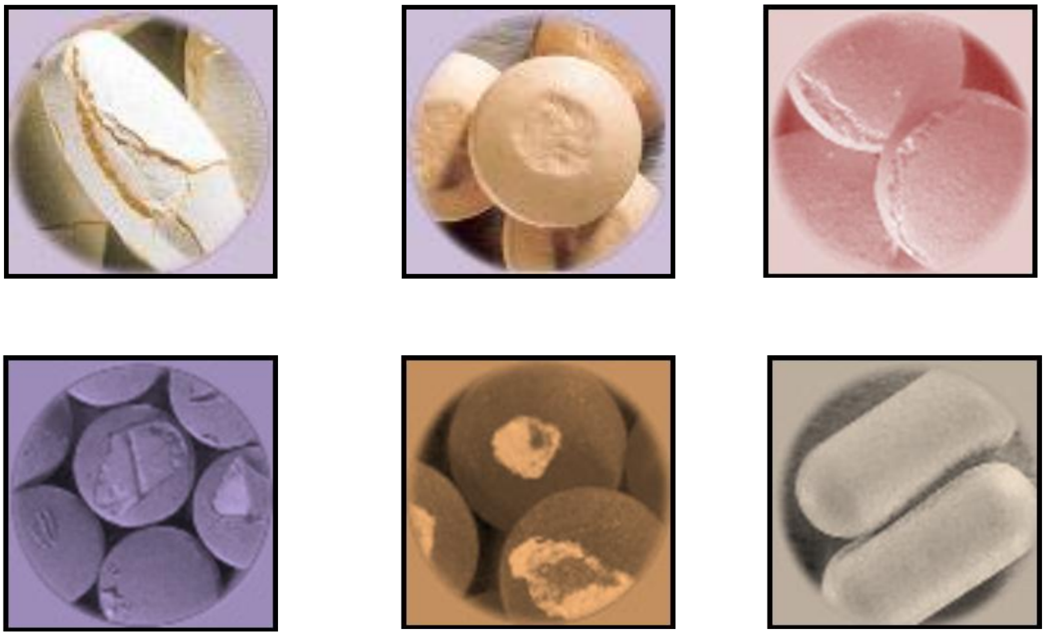


Figura 1. *Ejemplos de erosión de núcleos, agrietamiento, erosión de bordes, descamación, picado y pegado.*

- *Formas farmacéuticas líquidas:* Un aspecto de suma importancia en las formas farmacéuticas líquidas es la homogeneidad y la ausencia de desarrollo microbiano excesivo. El desarrollo microbiano puede ir acompañado de producción de gas. En el caso de suspensiones, se considerará evidencia de inestabilidad la formación de agregados que no sean fácilmente resuspendibles (coagulados).
- *Formas semisólidas:* La ruptura de una emulsión es uno de los signos más frecuentes de su inestabilidad (no debe confundirse con el cremado, una separación de la fase oleosa fácilmente reversible). Otros signos de inestabilidad son el crecimiento cristalino o la reducción por evaporación de la fase acuosa. Los ungüentos pueden sufrir “sangrado” (separación de cantidades excesivas de líquido). Los supositorios pueden liberar mal olor a causa de enranciamiento; como regla general, estos últimos siempre se almacenarán en heladera.

- Apropiado tratamiento de productos sometidos a manipulación adicional (reempacado, dilución o mezcla).
- Informar y educar al paciente: el farmacéutico está obligado a informar al paciente sobre las condiciones adecuadas de almacenamiento y es conveniente remarcar que la fecha de vencimiento tendrá validez sólo si dichas condiciones de almacenamiento se respetan.

Se debe recordar que los medicamentos una vez vencidos no se deben utilizar bajo ningún concepto y que se transforman en un tipo de residuos que pueden ser considerados peligrosos, pudiendo contener sustancias tóxicas o de especial cuidado.

Los medicamentos vencidos pueden provocar los siguientes efectos:

- Contaminación del agua potable
- Perjuicio de la vida acuática
- Muerte de microorganismos claves para el ecosistema
- Resistencia a microorganismos patógenos
- Liberación de contaminantes cuando son quemados en forma inapropiada
- Bioacumulación en tejidos de seres vivos
- Pasar a la cadena de distribución informal e ingresar nuevamente al mercado

Es muy importante recordar que la OMS establece que el concepto de Intercambiabilidad de medicamentos se debe aplicar no sólo a la forma farmacéutica sino también a las instrucciones de uso y a las especificaciones de los envases, cuando éstas son criticas para la estabilidad y vencimiento. Por ello es imprescindible que la información que aparece en los envases secundarios y en los prospectos de los medicamentos sea coherente y completa, respecto a condiciones de conservación: temperatura, luz, humedad.

Sería deseable lograr una unificación de criterios en este sentido lo cual no crearía incertidumbre, ni en los farmacéuticos oficinales u hospitalarios, ni en los pacientes, respecto de cómo almacenar los productos.

En relación a la estabilidad y conservación de drogas y medicamentos que necesitan para ello ser mantenidos a bajas temperaturas, repasaremos a continuación conceptos relacionados a la llamada Cadena de Frío.

Cadena de Frío

Se define la *cadena de frío* como la serie de elementos y actividades necesarios para garantizar que, a lo largo de los procesos de distribución, almacenamiento y manipulación, las drogas, medicamentos y vacunas sean conservados dentro de los rangos de temperatura establecidos para que mantengan su potencia o, en el caso de las vacunas, su poder inmunológico.

Eslabones de la cadena de frío

Recursos Humanos. Se requieren recursos humanos capacitados y concientizados en la importancia de la cadena de frío. La capacitación deberá incluir todos los aspectos relativos a la cadena de frío (pautas para optimizar el rendimiento de los equipos de frío, horas de vida en frío de cada dispositivo) y a la termoestabilidad de las distintas vacunas. Las personas que forman parte de la cadena de frío deben comprender que si cada eslabón de la cadena no se utiliza eficazmente no sólo se pone en riesgo la salud de la población sino que la total inversión de un programa de vacunación puede perderse. Una de las tareas del farmacéutico, como responsable de la elaboración y dispensación de vacunas y medicamentos, consiste en formar y concientizar al eslabón humano de la cadena de frío.

Recursos materiales. Se refiere a los dispositivos y elementos utilizados para asegurar que la temperatura de las vacunas y medicamentos se mantenga dentro del rango de temperaturas óptimo para su conservación (incluyen vehículos frigoríficos, refrigeradores portátiles, cajas isotérmicas, portavacunas, controladores de temperatura, cámaras frigoríficas, congeladores, heladeras,

etc). Respecto a la autonomía de las heladeras (denominada *hold over*, es decir, tiempo en el que la temperatura se mantiene entre 0 y 10ºC luego de un corte en el suministro eléctrico**)**, la OMS establece que debe ser, como mínimo, de seis horas.

Indudablemente el eslabón más débil de la cadena es el transporte, algunas soluciones para reforzarlo son utilizar:

- Indicadores electrónicos, con software de monitoreo y alarma
- Indicadores de temperatura (etiquetas sensibles a cambios de temperatura, con cambios de color)
- Registradores de datos
- Tecnología de identificación de frecuencia de radio (RFID)
- Contenedores aislados de poliestireno expandido o de espuma de uretano
- Refrigerantes

Pautas para el almacenaje de vacunas y medicamentos

En todos los niveles de almacenaje se deberá disponer o tener identificada una heladera auxiliar de referencia donde almacenar las vacunas en caso de avería de la heladera principal o durante la limpieza de ésta.

Realizar controles diarios de la temperatura de la heladera (se requiere de un termómetro o controlador de temperatura fiable). Llevar un registro de temperaturas.

En caso de no disponer de registro continuo de temperatura, ésta deberá ser controlada y registrada dos veces al día, una por la mañana y otra por la tarde.

Cualquier anomalía detectada deberá comunicarse rápidamente a servicios de mantenimiento

Ubicación de las vacunas. Deberán tenerse en cuenta varios aspectos:

Termoestabilidad: es conveniente almacenar las vacunas más termolábiles en las zonas más frías de la cámara o heladera, reservando las zonas menos frías para el almacenamiento de las vacunas más termoestables. Nunca colocar vacunas en la puerta o en el estante inferior.

Accesibilidad: conviene que las vacunas de salida más frecuente se ubiquen en los espacios más fácilmente accesibles; no sólo se busca limitar el número de veces que se abre la cámara o heladera para minimizar las variaciones de temperatura, sino también la duración de dichas aperturas.

Caducidad: las vacunas que se encuentren más próximas a su fecha de vencimiento deberán ubicarse en los espacios más accesibles.

Señalización. Es aconsejable la señalización (mediante un plano o croquis colocado en el exterior de la cámara, heladera o frigorífico) de la ubicación de las vacunas en el interior, con la finalidad de facilitar su localización, evitar aperturas innecesarias y limitar el tiempo de éstas. En el interior de la cámara también deben señalizarse los estantes o las zonas de almacenaje indicando: el tipo de vacuna, el laboratorio, el lote, la caducidad y el número de dosis almacenadas.

Control de la congelación de las vacunas. En el caso de no disponer de registro continuo de temperatura, es conveniente verificar, al iniciar la jornada, que las vacunas no han estado congeladas. Para lo cual deberá realizarse el test de agitación. Este es un test práctico, económico y fiable que consiste en agitar enérgicamente un vial de vacuna presuntamente congelada colocándolo después sobre una superficie plana y ante una luz. Se repite la operación con otro vial que no haya sido congelado, de la misma vacuna y del mismo fabricante y se comparan. En el momento mismo de la realización del test la vacuna no congelada aparece lisa y turbia, mientras que la congelada presenta gránulos o flóculos y menos turbidez. Esta diferencia se hace más evidente pasados unos minutos, así pues, si observamos el vial a los quince minutos de la realización del test, observaremos que la vacuna no congelada permanece lisa y turbia, mientras que en la congelada aparece un sedimento en el fondo del vial. Pasados treinta minutos, la vacuna no congelada empieza a aclararse pero no tiene sedimento, mientras la vacuna congelada es casi completamente

clara y con un sedimento denso. Si finalmente observamos los viales al cabo de una hora, veremos que la vacuna no congelada se mantiene medio clara con un sedimento turbio y espeso que se mueve cuando se inclina el frasco mientras que la vacuna congelada aparece completamente sedimentada, con un sedimento que apenas se mueve al inclinar el frasco. Es recomendable realizar este test en el momento de la recepción de las vacunas y ante la sospecha de que hayan podido congelarse durante el almacenamiento. Si la vacuna ha sido congelada debe desecharse.

Control de la caducidad de las vacunas. Llevar un registro de la fecha de vencimiento de cada uno de los lotes almacenados.

Mantenimiento del congelador. Inspeccionar diariamente el congelador y comprobar que no haya habido descongelación o que la capa de hielo no tiene un grosor superior a 5mm. Un sistema práctico para poder comprobar si se ha producido descongelación, es colocar sobre la placa del congelador un par de cubitos de hielo. Si, al inspeccionar el congelador, los cubitos han perdido su forma inicial, significará que ha existido un ciclo de descongelación-congelación. Cuando el grosor de la capa de hielo del congelador supere los 5mm, deberá procederse a su descongelación. Si se utilizan acumuladores de frío se refrigerarán en la heladera antes de colocarlos en el congelador. Al almacenarlos en el congelador deberán colocarse sobre la placa de éste y no apilados unos sobre otros. En el congelador es conveniente disponer siempre de acumuladores congelados. Esto contribuirá a que la temperatura del congelador sea más fría y por tanto a que los nuevos acumuladores se congelen con mayor rapidez.

Mantenimiento de la heladera y de las heladeras portátiles. Tener siempre botellas de agua (o acumuladores llenos de agua) colocados en los espacios libres de la heladera con la finalidad de estabilizar más rápidamente la temperatura en caso de aperturas y de aumentar la duración de la refrigeración en caso de avería. Evitar siempre el almacenamiento de bebidas o alimentos en la heladera, ya que el calor de los alimentos y de las bebidas, así como la apertura reiterada de la puerta, harán aumentar la temperatura interior de la heladera, lo cual puede deteriorar las vacunas. Cuando se utilicen las

heladeras portátiles, deberá tenerse la precaución de limpiarlas después de cada uso y quitarles la tapa, para facilitar su secado. Después de cada utilización es conveniente examinar las paredes internas y externas de la heladera para detectar la aparición de fisuras o grietas, en cuyo caso, y de no poder repararlas, se deberá cambiar la heladera. La exposición directa al sol de estas heladeras puede provocar la aparición de estas fisuras o abombamiento, por lo que siempre deberá evitarse dicha exposición.
Controlar la autonomía de la heladera.

Otras estrategias para garantizar la cadena de frío

Uso de sensores de control de los viales de vacuna. Un cuadrado sensible al calor situado en el interior de un círculo cambia de color bajo la influencia combinada del calor y del tiempo. Si tras la exposición al calor durante un cierto lapso el cuadrado alcanza el mismo color que el círculo, o lo supera en intensidad, debe descartarse el vial.

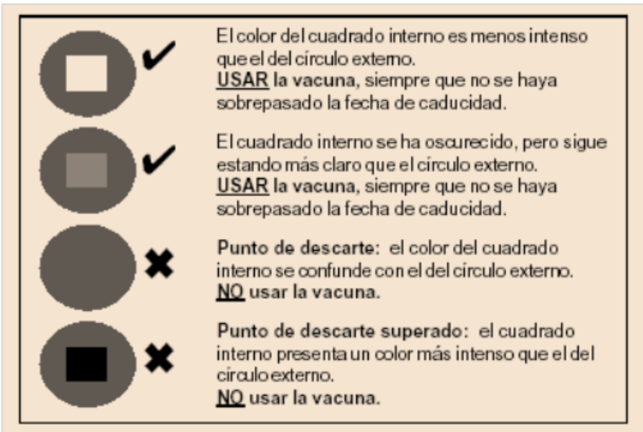
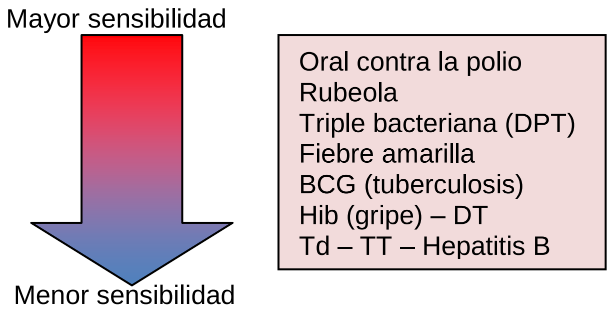


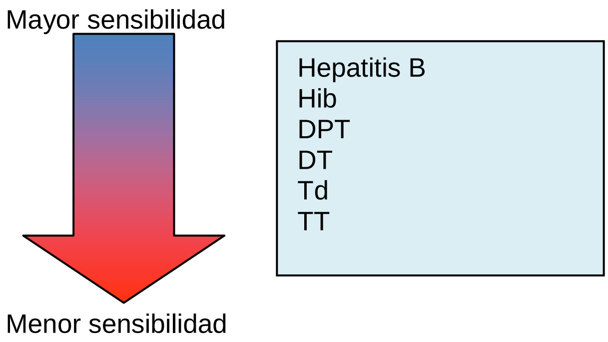
Figura 2. *Indicadores de control de temperatura*

Recordar que la sensibilidad a la temperatura en el caso de las vacunas no sólo implica sensibilidad al calor, sino también al exceso de frío.

Sensibilidad de las vacunas al calor:



Sensibilidad de las vacunas al frío:



Preguntas Orientadoras

1. Objetivos de un estudio de estabilidad. Cómo se determina la fecha de vencimiento de una especialidad y cómo se estima el período útil de una preparación magistral?

2. Qué tipos de estudios de estabilidad conoce?

3. Como elaboraría un protocolo para determinar la fecha de vencimiento de una formulación farmacéutica?

4. Enumere los estudios de estabilidad de los productos destinados para almacenar a Temperatura Ambiente. Describa condiciones y tiempo/s de muestreo/s.
5. Qué factores pueden afectar la estabilidad de un producto?

6. Qué medidas deben llevarse a cabo para controlar y optimizar el funcionamiento de un equipo de refrigeración destinado a almacenar vacunas y otros medicamentos que requieren cadena de frío.

Test de Autoevaluación

1. Cuál de estos factores afecta la estabilidad de una forma farmacéutica líquida?
   (a) Humedad
   (b) pH
   (c) Solubilidad
   (d) Indice de refracción

2. A cuál de estas materias primas hay que proteger en especial de la Humedad?
   (a) Droga con una función fenólica
   (b) Droga con una función éster
   (c) Droga con una función aldehido
   (d) Droga con una función alcohólica.

3. A cuál de estas materias primas hay que proteger en especial de la Oxidación?
   (a) Droga con una función fenólica
   (b) Droga con una función éster
   (c) Droga con una función amina
   (d) Droga con una función amida.

4. Cuál de estos factores puede afectar la estabilidad de una forma farmacéutica sólida?
    (a) Humedad
    (b) pH
    (c) Solubilidad
    (d) Indice de refracción

5. Las reacciones de Hidrólisis afectan a las materias primas con el siguiente grupo funcional
    (a) Función fenólica
    (b) Función éster
    (c) Función amina
    (d) Función cetona.

Bibliografía

1. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VII ed. (2003) Buenos Aires.
2. International Conference on Harmonisation (ICH) *Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products* (1996) Silver Spring.
3. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 34) (2011) Rockville.
4. US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research, ICH. *Guidance for industry Q1A: Stability Testing of New Drug Substances and Products, Revision I.* (2001)
5. Trissell L. A.; Flora K. P. (1998) *Stability studies: five years later*. Am J Hosp Pharm., 45:1569-1571
6. Nichols C. A.; Welsh O. H. Jr. (1998) *AJHP policy on manuscripts dealing with drug stability*. Am J Hosp Pharm., 45:1571-1572

7. Soriano M. C.; Sánchez – Lafuente C.; Álvarez – Puentes J.; Holgado M. A. (2000) *Acondicionamiento de medicamentos: funciones y tipos de envasado.* Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

8. Departamento de Vacunas y Productos Biológicos, Organización Mundial de la Salud. (2000) *Uso de los sensores de control de los viales de vacuna*. Ginebra.

9. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and American Academy of Family Physicians (AAFP). (2003) *Guidelines for Maintaining and Managing the Vaccine Cold Chain*. MMWR Weekly

10. Boletín de la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. (2003) *Cadena de frío y logística de los programas de vacunación.*

CAPITULO 13

ENSAYOS BIOLÓGICOS

Pablo Quiroga

Introducción

En general, los sistemas de control de calidad para productos biofarmacéuticos son muy similares a los utilizados rutinariamente en productos farmacéuticos de bajo peso molecular, la diferencia fundamental entre estos sistemas de control de calidad para productos obtenidos por biotecnología y productos farmacéuticos tradicionales reside en el tipo de métodos que se emplean para determinar la identidad del producto, su uniformidad, su pureza y el perfil de impurezas. La complejidad de los sistemas de control de calidad para los productos biofarmacéuticos está relacionada con el tamaño y con las características estructurales del producto y el proceso de fabricación.

En este capítulo desarrollaremos los fundamentos y principios básicos de los Ensayos Biológicos o Bioensayos los cuales constituyen una parte integral de la evaluación de la calidad de productos de origen biológico y son utilizados comúnmente para la estimación de la potencia de un principio activo.

Biofarmacéuticos/Bioterapéuticos

Agentes terapéuticos producidos a partir de organismos vivos o sus productos (incluyendo tecnología ADN recombinante, procesos de manufactura biotecnológica, y síntesis química utilizando nucleótidos o aminoácidos) e incluye los anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, péptidos, factores de reemplazo, proteínas de fusión, oligonucleótidos, y preparaciones de ADN para terapia génica. Esta clase de agentes terapéuticos ha tenido un gran crecimiento en estos últimos años y han sido y son utilizados para un

amplio espectro de indicaciones terapéuticas que van desde la oncología y enfermedades autoinmunes hasta enfermedades huérfanas y de origen genético. Si bien las vacunas y otros productos biológicos no están incluidos en la definición anterior, la determinación de su potencia relativa es realizada aplicando los ensayos biológicos o bioensayos.

Ensayos Biológicos o Bioensayos: se describen para la valoración de ciertas sustancias y preparaciones cuya potencia no puede garantizarse adecuadamente mediante análisis químico o físico. El principio a aplicar, siempre que sea posible, a lo largo de estos ensayos, es comparar una preparación desconocida con una preparación patrón y determinar que cantidad de la sustancia, que sé está examinando, produce el mismo efecto biológico que una cantidad dada, *la Unidad*, de la preparación patrón / estándar de referencia. Es una condición esencial, que los ensayos sobre la preparación estándar y sobre la sustancia a examinar se realicen al mismo tiempo y bajo condiciones tan idénticas como sea posible (Farmacopea Europea Suplemento 2000, capitulo 5.3 Statistical Análisis of Results of Biological Assay and Tests).

Estos ensayos se diferencian de los ensayos fisicoquímicos por su dependencia de un sustrato biológico (ej. Animales, células vivas, o complejos funcionales de receptores blancos).

Estos ensayos constituyen herramientas fundamentales en la determinación de la potencia y el aseguramiento de la actividad de proteínas, vacunas, terapia celular, terapia génica, y mezclas complejas, los mismos juegan un rol muy importante en el monitoreo de la estabilidad de los productos biofarmacéuticos.

Por lo tanto las aplicaciones comunes de los ensayos biológicos incluyen la caracterización de los productos biológicos y biotecnológicos, liberación de lotes productivos y estudios de estabilidad.

Como hemos visto en la definición de ensayo biológico los mismos son ensayos relativos por lo cual debemos contar con materiales biológicos de referencia, la Organización Mundial de la Salud (OMS / WHO) provee dichos materiales referencia (al igual que la Farmacopea de Estados Unidos-USP y la European Pharmacopoeia-EP), los cuales sirven como fuente de referencia para una actividad biológica definida la cual es expresada internacionalmente

como *Unidad*. El concepto de la utilización de preparaciones bien caracterizadas como referencia contra los cuales diferentes lotes de productos biológicos son valorados, continua siendo fundamental para asegurar la calidad de los productos biológicos y también para demostrar la consistencia en la producción de los mismos, los cuales son esenciales para el establecimiento de apropiados niveles clínicos de dosificación.

La OMS en su WHO Technical Report Series, No. 932, 2006- Anexo 2 define a *estándar de referencia* como *"materiales que son utilizados como calibradores en los ensayos"*. La OMS provee estándar de referencia para un rango de sustancias las cuales son consideradas como "biológicos": sustancias las cuales no pueden ser completamente caracterizadas solamente por métodos fisicoquímicos, y requieren de esta manera la utilización/aplicación de alguna forma de ensayo biológico. Los estándar de referencia son provistos para la calibración de los ensayos basados en la interacción de componentes de sistemas vivos, incluyendo aquellos basados en la función biológica, reactividad inmunológica, activación y amplificación enzimática y actúan como estándares globales de "orden superior" para la medición de los analitos que ellos definen. Para la liberación de lotes productivos, los bioensayos son utilizados para evaluar la potencia del principio activo antes de la liberación del producto biofarmacéutico, vacunas, etc. En estos se debe establecer una especificación de liberación, mediante la definición de un rango de valores de potencia que son aceptables para el producto en sus condiciones de almacenamiento / conservación declaradas hasta su fecha de vencimiento.

Los Bioensayos pueden ser divididos en:

Bioensayos in vivo. (animales)

Bioensayos ex vivo.

Bioensayos in vitro (células)

Bioensayos in vivo: los ensayos de potencia in vivo son bioensayos en los cuales un número de diluciones tanto del estándar como del material test son administradas a los animales, para la estimación de la potencia se utiliza una relación *Dosis vs. Respuesta.* Con la aparición de líneas celulares específicas para mecanismo de acción fisiológico propuesto, la utilización de animales para

la determinación de la potencia ha sido ampliamente disminuida. Cuando la actividad in vitro no está fuertemente asociada con la actividad in vivo, es necesario recurrir a una combinación de ensayos in vitro basados en células y un adecuado método fisicoquímico para poder sustituir un bioensayo in vivo.

Bioensayos ex vivo: en este tipo de bioensayos células o tejidos obtenidos de animales o donantes humanos pueden ser cultivados en el laboratorio y utilizados para la valoración de una preparación Desconocida.

Bioensayos in vitro (basados en células): estos bioensayos utilizan clones de líneas celulares que responden a un ligando o agente infeccioso específico y pueden ser utilizados como ensayos de liberación de lotes de bioterapéuticos. Estás líneas celulares pueden derivar de tumores, líneas celulares de ingeniería transfectadas con un receptor apropiado, entre otros. Los avances en la tecnología ADN recombinante y el entendimiento de los mecanismos de señalización celular han permitido la generación de líneas celulares de ingeniería las cuales mejoran la respuesta y aumentan la estabilidad de las mismas. Las respuestas incluyen: proliferación celular, muerte celular, actividad antiviral, diferenciación, secreción de citoquinas/mediadores y activación enzimática.

Teniendo en cuenta lo indicado en el Tópico Q6B de ICH no siempre es necesario en el ensayo biológico reproducir exactamente la actividad Biológica del producto en una situación clínica, pero deberá previamente establecerse en estudios farmacodinámicos o clínicos una correlación entre la respuesta clínica esperada y la actividad evaluada en el ensayo biológico.

¿Cuándo debemos recurrir a un ensayo biológico?

- Cuando la droga no puede ser valorada por procedimientos químicos o físicos por no presentar características que lo hagan posible

- Cuando los métodos químicos o físicos no son capaces de distinguir diferencias estructurales de la droga, que sin embargo repercuten considerablemente en su actividad biológica.

- Cuando la presencia de otros compuestos interfiere en las valoraciones físicas o químicas.

- Cuando el principio activo se encuentra en una concentración tan pequeña que no es posible detectarlo por ningún método físico o químico.

Los bioensayos se basan en la relación Dosis/Concentración vs. Respuesta

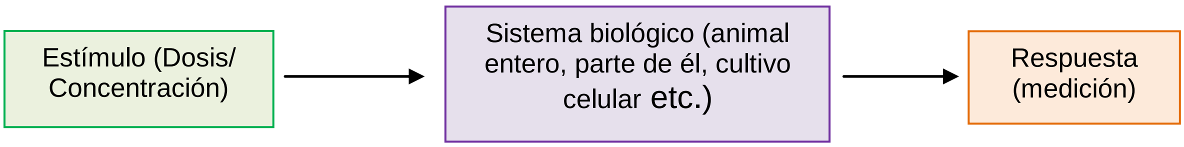


Figura 1. *Esquema relación dosis/concentración- respuesta*

Una vez obtenida la respuesta sé gráfica la *dosis/concentración* vs la *Respuesta media de ¨n¨ determinaciones,* la respuesta (Y) puede ser directamente la respuesta medida o una transformación de la misma y en el caso de la dosis o concentración (X) se utiliza fundamentalmente la transformación logarítmica, diferentes funciones matemáticas pueden ser utilizadas para describir de manera adecuada y correcta la relación dosis/ concentración- respuesta tal que los valores de Y de X satisfagan la hipótesis de linealidad $Y = a + bX$.

Clasificación de los Ensayos Biológicos

Los ensayos biológicos los podemos clasificar en: *Ensayos Directos* y *Ensayos Indirectos*:

Ensayo Directo: es aquel en el cual se mide la dosis de la preparación Estándar y Desconocido que producen una respuesta biológica específica y bien definida, la respuesta es fija, y la dosis variable llamada *dosis umbral*. El cociente entre la dosis umbral media para la preparación Estándar y la dosis umbral media para la preparación Test proporciona directamente la potencia. La dosis umbral se determina dos veces en cada animal, una con el Estándar y

la otra con el Desconocido, posteriormente cada dosis se convierte en su logaritmo, se determina la diferencia entre ambos logaritmos de las dosis respectivas para cada animal y se calcula la potencia a partir del promedio de estas diferencias. Los ensayos directos no siempre son posibles**,** el mayor inconveniente está en la determinación exacta de la dosis que produce respuesta biológica específica, a continuación se describe en ejemplo de este tipo de ensayo.

Bioensayo in vivo. Valoración de Adrenalina de F.A. VI ed.

Procedimiento

Se preparan las soluciones Estándar de adrenalina y de la solución Desconocida en solución al 0.9 % de ClNa en agua para inyectable (sol. Fisiológica), se anestesia el animal con solución de cloralosa 8%, se aísla la carótida y se le conecta un manómetro de Hg el cual permite registrar la presión arterial, posteriormente se le inyecta por vena un volumen de la solución patrón de adrenalina hasta obtener la respuesta indicada, cuando la presión vuelve a su nivel inicial se repite la inyección de la misma dosis, deberá obtenerse en esta y 2-3 inyecciones sucesivas la misma respuesta. Una vez fijada la dosis del patrón que produce un efecto constante se determina, procediendo de forma análoga, la dosis de la solución a valorar que produzca la misma respuesta, posteriormente se procede a inyectar nuevamente la solución de adrenalina Estándar, con el objetivo de comprobar que la sensibilidad del animal no ha variado. De la comparación de las dosis umbral de ambas soluciones transformadas a logaritmo, se calcula la *Potencia Relativa (PR)* de la sustancia Desconocida, de acuerdo a la siguiente fórmula:

PR= DE/DD aplicando la transformación logarítmica de los valores de dosis,

log PR = log DE – log DD = M

PR = Antilog M

PR: Potencia Relativa

DE: Dosis de la preparación Estándar requerida para producir la respuesta biológica específica y definida.

DD: Dosis de la preparación Desconocida requerida para producir la misma respuesta.

*Ensayo Indirecto***:** En estos ensayos por lo general la dosis umbral no puede medirse directamente, por lo tanto la potencia se determina de manera indirecta por comparación de las respuestas a dosis conocidas del Estándar y las respuestas después de una o varias dosis del Desconocido, es decir en este tipo de ensayos se administran dosis predeterminadas de la preparación Desconocida y de la preparación Estándar y se registran las respuestas de cada unidad experimental a cada dosis administrada.

Existen fundamentalmente dos tipos de datos en este tipo de ensayos:

A. Respuestas Graduales o cuantitativas

B. Respuestas Cuantales - Cualitativas o del Todo o nada.

Esta clasificación se refiere a la naturaleza de la respuesta utilizada para la construcción del modelo (relación *Dosis/Concentración vs. Respuesta*) en el ensayo.

*A. Respuestas graduales o cuantitativas***:** estas respuestas son mediciones numericas sobre una escala continua (Ej. Respuesta espectrofotometrica, luminiscencia, densidad optica, peso corporal, etc.) son aquellas en las cuales se administran diferentes *Dosis/Concentraciones* del preparado Estándar y del Desconocido a cada unidad experimental (en el caso de un bioensayo en vivo) y se mide el efecto o respuesta en cada una de ellas sobre la base de una escala cuantitativa, es decir en cada unidad experimental se observa y cuantifica una respuesta (ej. si la unidad experimental es el ratón y cada grupo tratado esta compuesto por 6 ratones, obtendremos un valor para cada uno de los 6 ratones, a partir de los resultados individuales se obtiene un valor medio con su respectiva dispersión). Los ensayos que se basan en este tipo de respuesta se denominan *Ensayos Cuantitativos***.**

*B. Respuestas Cuantales - Cualitativas o del "Todo o nada***":** son respuestas categoricas, aquellas en las cuales es imposible o excesivamente laborioso cuantificar o medir la respuesta en cada unidad experimental, por lo tanto se evalua si un efecto o sintoma (ej. muerte o sobrevida, ausencia o presencia de convulsiones) ocurre o no ocurre en cada unidad experimental, en este caso en lugar de tener "**n**" valores individuales de respuesta, tendríamos un solo valor para cada tratamiento, este valor se expresa como la fracción o el porcentaje

de unidades experimentales en cada grupo tratado que ha mostrado una respuesta determinada. Ej. si la unidad experimental es el ratón y cada grupo está compuesto por 10 ratones y la respuesta buscada es la muerte o sobrevida del animal, si 6 animales mueren, entonces el resultado será 6/10 o sea 0.6 o 60%. Los ensayos que se basan en este tipo de respuesta se denominan *Ensayos Cuantales,* a continuación se describe un ejemplo de Ensayo Cuantal

Ejemplo:

Valoración de Insulina por inyección subcutánea en ratón. (European Pharmacopeia, 1997)

Respuesta: presencia de convulsiones debido a hipoglucemia dentro de los 75 minutos posteriores a la inyección subcutánea de insulina.

Procedimiento: Se administran 2 dosis de 24 miliunidades/ratón y 40 miliunidades/ratón contenidas en un volumen de 0.25 ml, de la preparación patrón, dosis equivalentes de la preparación desconocida son preparadas en base a la potencia declarada. Cada dosis de la preparación Estándar y Desconocida son administradas a grupos de 24 ratones cada uno. Se presentan los resultados en la Tabla 1.

Preparación	Dosis (MU)	(n)*	(r)°	P= r/n
Estándar (E)	40 (E1)	24	21	0.88
	24 (E2)	24	8	0.33
Desconocido (D)	40 (T1)#	24	20	0.83
	24 (T2)#	24	10	0.42

Tabla 1. * *N° de ratones por grupo, ° N° de ratones por grupo que presentaron respuesta, # Las dosis de la preparación Desconocida fueron preparadas basándose en la potencia declarada.*

Validación de los Ensayos Biológicos

Antes de aplicar un ensayo biológico en nuestro laboratorio, debemos proceder a validar el mismo con el objetivo de evaluar las condiciones o características operacionales del procedimiento propuesto, tal cual lo descripto en el Capítulo 2 de este libro.

La validación de un ensayo biológico deberá incluir muestras que sean representativas del material que será evaluado durante el mismo, con el objetivo de evaluar su performance.

Para estudiar las propiedades de los reactivos empleados (animales, líneas celulares, etc) y las condiciones de nuestro laboratorio, el primer paso es obtener una curva *Dosis/Concentración vs. Respuesta* con la preparación Estándar, con un buen nivel de precisión y en un amplio rango de dosis, en el caso de un ensayo in vivo, se utilizará un número determinado de animales (por ej. 30), divididos en seis grupos, cada grupo es administrado con un nivel de dosificación, es decir evaluamos 6 Dosis diferentes en total. En general cuando se gráfica Dosis/Concentración o log. Dosis/Concentración vs. Respuesta, las curvas obtenidas tiene forma sigmoideas, pero sólo debemos considerar la parte central de dicha curva que es lineal, la cual toma el nombre de línea de regresión Figura 2.

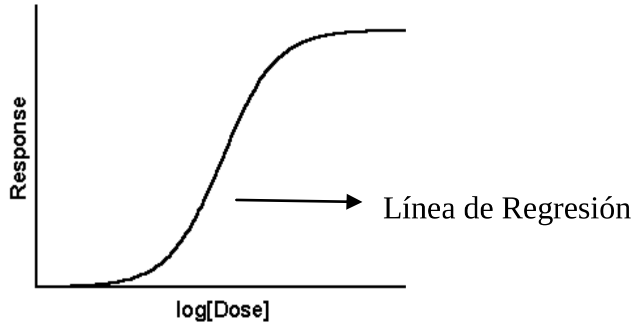


Figura 2. *Relación Logaritmo Dosis - Respuesta*

Los parámetros a evaluar para la validación son similares a los descriptos en el capítulo 2 y son: exactitud relativa, especificidad, precisión intermedia y rango, respecto de otros parámetros como el límite de cuantificación y detección los mismos en general no son considerados relevantes para un ensayo biológico

donde el objetivo sea reportar una potencia relativa, si bien la robustez no es un requerimiento en la validación de los bioensayos, es recomendable realizarlo como pre-validación o mediante ensayos adicionales inmediatamente posterior a la validación.

Las definiciones para los parámetros descriptos anteriormente son las mismas que las dadas en el capítulo de validaciones, la diferencia es que en estos casos estamos en un ensayo biológico.

Métodos utilizados para el cálculo de la potencia relativa

Una vez validado el ensayo biológico procederemos a aplicar el ensayo como control de calidad de rutina en las condiciones establecidas en la validación, para lo cual deben ensayarse la preparación Estándar y Desconocido simultáneamente, obteniéndose 2 curvas *Dosis/Concentración vs. Respuesta*: una para el Estándar y otra para el Desconocido, las cuales se compararán entre sí y por medio de análisis estadístico se estimara la potencia relativa y el intervalo de confianza del 95 % de probabilidad.

Para seleccionar el método/modelo estadístico a aplicar en un bioensayo para calcular la potencia relativa, debemos considerar: el tipo de dato y el diseño del bioensayo, en general el modelo debe reflejar fuertemente el diseño del mismo (completamente al azar, bloques al azar, etc.).

En los métodos para el cálculo de la potencia relativa, se asume primariamente la similaridad o similitud, dos preparaciones son similares si ellas contienen el mismo o los mismos constituyentes efectivos y en la misma proporción. Si esta condición se cumple, la preparación Desconocida se comporta como una dilución (o concentración) de la preparación Estándar.

La similaridad o similitud puede ser representada matemáticamente por la siguiente fórmula:

$F_T(Z) = F_S(\rho Z)$

F_T: función dosis/concentración – respuesta para la preparación Desconocida

F_S: función dosis/concentración – respuesta para la preparación Estándar

Z: representa la dosis/concentración

ρ: potencia relativa de la muestra Desconocida relativa al Estándar

Los modelos estadísticos para la estimación de ρ en los ensayos cuantitativos pueden ser:

Modelos estadísticos → *Relación de pendientes (I)*

Modelos estadísticos → *Líneas Paralelas (II)*

Para ambos modelos se asumen las siguientes condiciones: todos incluyen un término residual, el cual se asume que es independiente de una medición a otra y que tiene una variancia constante entre diferentes concentraciones.

Para aplicar cualquiera de estos dos modelos estadísticos deben cumplirse las siguientes condiciones:

1. Los diferentes tratamientos deben ser asignados al azar a las unidades experimentales.

2. Las respuestas a cada tratamiento deben distribuirse normalmente.

3. La desviación estándar de las respuestas dentro de cada grupo de tratamiento, para la preparación Estándar y Desconocida, no debe diferir significativamente una de otra (homocedasticidad de los datos).

4. Cada preparación (Estándar y Desconocida) en el ensayo debe ser contrastada con el mismo número de dosis.

5. En el modelo de relación de pendientes, el intervalo entre dosis/ concentraciones adyacentes debe ser constante para todos los tratamientos en el ensayo (progresión aritmética), en el modelo de líneas paralelas, el cociente entre las dosis / concentraciones adyacentes debe ser constante para todos los tratamientos del ensayo (progresión geométrica).

6. Debe haber un número igual de unidades experimentales para cada tratamiento.

I. Modelo de relación de pendientes, este modelo puede aplicarse cuando:

A. La relación entre *la dosis / concentración y la respuesta* es lineal.

B. Las rectas *Dosis/Concentración vs. Respuesta* del Estándar y del Desconocido tienen la misma ordenada al origen (no necesariamente debe

corresponder al origen de coordenadas), lo cual demuestra la similitud estadística.

Para que el ensayo sea estadísticamente válido deben cumplirse, además de las ya mencionadas (1, 2, 3) las siguientes condiciones:

1. La variación debida a los blancos en los diseños (h x d + 1) debe ser no significativa, es decir la respuesta debida a los blancos no difiere significativamente. En el ejemplo anterior sería (2 x 3 + 1)

dónde:

° h : Número de preparaciones en el ensayo incluyendo la preparación Estándar

° d : Número de niveles de dosis para cada preparación (excluyendo el blanco)

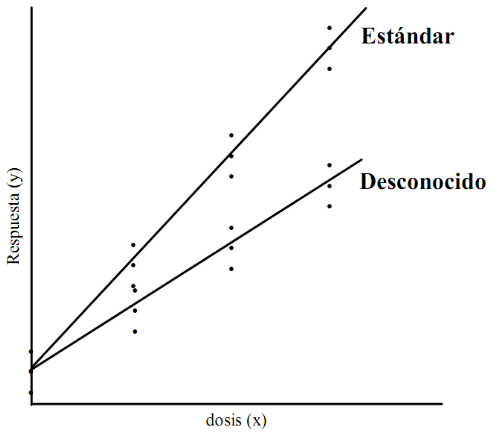


Figura 3. *Relación Dosis – Respuesta- Modelo de relación de pendientes*

2. Demostrar estadísticamente la igualdad de las ordenadas al origen.

3. Demostrar linealidad (para ensayos que incluyen al menos tres dosis), el mismo indica que la relación entre la dosis y la respuesta puede representarse por una línea recta en todo el intervalo de dosis utilizadas, los valores medios de respuesta de las preparaciones no se apartan significativamente de una recta en el rango de dosis/concentraciones utilizadas.

Una vez establecida la validez estadística, se procede a estimar la potencia y el intervalo de confianza del 95 % de probabilidad, a continuación se detallan las ecuaciones para el cálculo de la potencia relativa:

Para la Preparación Estándar:

$Y = a + b\, D_E$ D_E = *Dosis preparación del Estándar*

Para la preparación Desconocida:

$Y = a + b^1\, D_D$ D_D = *Dosis preparación Desconocida*

Como hemos comprobado que el ensayo es válido podemos asegurar que las rectas tienen una ordenada al origen (a) igual, pero difieren en el valor de la pendiente (b y b^1), si consideramos D_E y D_D frente a la misma respuesta Y, igualando ambas ecuaciones tenemos:

$\not{a} + b\, D_E = \not{a} + b^1\, D_D$

$D_E / D_D = b^1 / b$

$PR = D_E / D_D$

$PR = b^1 / b = \rho$

La Potencia relativa (ρ) de la preparación Desconocida está dada por la relación de pendientes de ambas rectas, debido a esto este tipo de modelo se denomina *Modelo de Relación de Pendientes*.

II. Modelo de líneas paralelas, para aplicar este modelo deben cumplirse las siguientes condiciones:

A. La relación entre el *logaritmo de la dosis y la respuesta* se representa por una línea recta en el intervalo de *Dosis/Concentración* utilizadas

B. Para cualquier preparación Test en el ensayo, la línea recta es paralela al Estándar, lo cual demuestra la similitud estadística.

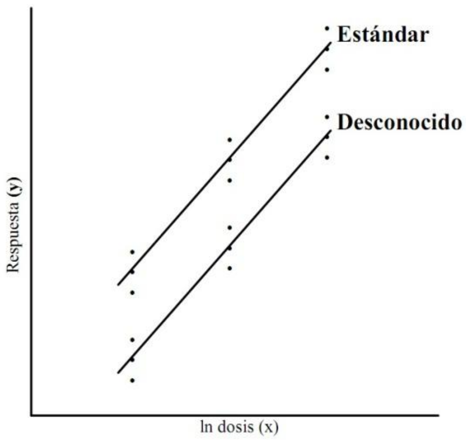


Figura 4. *Relación Logaritmo Dosis/Concentración vs. Respuesta -Modelo de líneas paralelas*

Para que el ensayo sea estadísticamente válido deben cumplirse las siguientes condiciones:

1. *Hipótesis de regresión*: La pendiente de la curva log Dosis/*Concentración vs. Respuesta* difiere significativamente de cero.

2. *Hipótesis de paralelismo*: Para cualquier preparación Desconocida en el ensayo, la línea recta es paralela al Estándar.

3. *Hipótesis de linealidad*: La relación entre el logaritmo de la dosis/ concentración y la respuesta debe representarse por una línea recta en todo el intervalo de dosis utilizadas. Una vez establecida la validez estadística, se procede a estimar la potencia relativa y el intervalo de confianza del 95 % de probabilidad.

Hemos demostrado que el término de linealidad es significativo entonces procedemos a calcular la potencia para cada preparación Desconocida:

$Y = a + b \log D_E$

$Y = a^1 + b \log D_D$

Hemos demostrado que ambas rectas son paralelas por lo tanto tienen la misma pendiente (b) pero distinta ordenada al origen, trabajando a iguales valores de respuesta (y)

$a + b \log D_E = a^1 + b \log D_D$ (1)

Despejando $\mathbf{a^1}$

$a^1 = a + b \log D_E - b \log D_D$

$a^1 = a + b (\log D_E - \log D_D)$ como $\log. D_E - \log D_D = \log PR$

$a^1 = a + b \log PR$

Reemplazando en (1) obtengo:

$a + b \log D_E = a + b \log PR + b \log D_D$

$b \log. D_E = b (\log PR + \log D_D)$

$\log. D_E = \log PR + \log D_D$

$\log PR = \log D_E - \log D_D$

$\log PR = \log (D_E / D_D) = \log \rho$

Podemos observar que cuando las líneas *Dosis/Concentración vs. Respuesta* son paralelas, la separación horizontal corresponde para una misma respuesta

a la diferencia en el nivel de actividad biologica, esta diferencia horizontal corresponde numericamente a log ρ (logaritmo de la Potencia Relativa).

En la siguiente Tabla se resumen las condiciones que deben cumplirse para aplicar cada uno de los modelos estadísticos discutidos anteriormente.

Condiciones para su aplicación	**Modelo Relación de Pendientes**	**Modelo de líneas Paralelas**
Regresión	X	X
Linealidad	X	X
Intersección	X	_
Paralelismo	_	X

Tabla 2. *Condiciones para la aplicación de los modelos estadísticos*

Ensayos cuantales: para los ensayos biológicos que dependen de respuestas cuantales se aplica el *modelo estadístico de líneas paralelas*.

Como hemos visto anteriormente en estos ensayos se registra la fracción de unidades experimentales en cada grupo tratado que ha mostrado una respuesta determinada, cuando estas fracciones son graficadas vs. el log. de las dosis la curva resultante es sigmoidea más que lineal, entonces una función matemática que representa esta curvatura sigmoidea es utilizada para estimar la curva *Dosis vs. - Respuesta*, la función más comúnmente utilizada es la *función de distribución normal acumulativa*, de esta manera transformamos una curva sigmoidea en lineal, es decir ahora se reemplaza cada respuesta (ej. fracción o porcentaje de respuesta por grupo) por el correspondiente valor de la distribución normal acumulativa estándar este valor usualmente llamado "normit" tiene un rango teórico entre - ∝; + ∝, entonces se propuso adicionar el valor 5 a cada "normit" dando origen al termino *probit*, una vez que la curva Dosis - Respuesta ha sido linealizada es posible aplicar el modelo de líneas paralelas. Antes de calcular la potencia y el intervalo de confianza debe determinarse que el ensayo es estadísticamente válido, para esto deben cumplirse las hipótesis de linealidad y de paralelismo explicadas anteriormente.

Combinación Ponderada de resultados de múltiples ensayos

En general, un solo ensayo no es suficiente para reportar un valor de potencia relativa para cumplir con las exigencias regulatorias, por lo tanto con el objetivo de disminuir los efectos de la variabilidad, es necesario la repetición de bioensayos independientes y combinar los resultados de los mismos para obtener un solo valor reportable de Potencia Relativa. Para que puedan combinarse los resultados de los diferentes bioensayos se debe demostrar que los mismos son:

1. Independientes (la ejecución de un ensayo no afecta las probabilidades de los posibles del otro), los errores aleatorios en la totalidad de los factores esenciales que influyen sobre el resultado en un bioensayo, tienen que ser independientes de los correspondientes aleatorios en el otro. Ensayos realizados en distintos días pero utilizando las mismas soluciones originales y conservadas de Estándar no corresponden a ensayos independientes.
2. Las potencias individuales estimadas forman un conjunto homogéneo: los resultados son considerados homogéneos cuando difieren solamente debido a los errores al azar dentro del ensayo.
3. El número de grados de libertad de los errores residuales individuales, no es inferior a 6 y preferiblemente es mayor a 15.
4. Para cada ensayo el valor de C está próximo a 1 (menor de 1.1)

Hipótesis Esenciales para la validez fundamental de los Ensayos Biológicos

A. Las diferencias entre los valores medios de las respuesta debido a los distintos tratamientos se deben únicamente a los mismos o a variaciones muéstrales del azar, con esto estamos suponiendo que todos los demás factores que indudablemente afectan las respuestas han sido controlados por el investigador. Por lo tanto el investigador debe estudiar cuales son las condiciones que pueden modificar las respuestas y poder controlarlas, por ej:

A1. Deberán mantenerse constantes las condiciones ambientales (macro y microambiente)

A2. El experimento deberá diseñarse tal que las distintas fuentes de variabilidad puedan segregarse en el análisis de varianza.

A3. Distribuir las unidades experimentales al azar entre los distintos tratamientos. Azar significa: un método de selección de unidades de muestreo de modo tal que una muestra tenga una probabilidad fija y determinada de ser seleccionada.

B. La respuesta esperada debe ser una función monótona determinable de la dosis dentro del rango de dosis utilizadas, es decir que siempre crece o siempre decrece. Muchos errores pueden cometerse cuando los ensayos son realizados con pocas dosis y sobre reactivos biológicos no bien conocidos como ser la cepa o colonia de rata que se emplea etc. Entonces con dosis muy grandes pueden obtenerse respuestas que pueden ser menores que las correspondientes respuestas a dosis más bajas, por lo tanto debe conocerse el sistema biológico de manera de asegurar que las respuestas que se está evaluando invaliden el ensayo en lo fundamental, este hecho puede no ser detectado con los test estadísticos.

C. Las respuestas producidas por la preparación Estándar y la preparación Desconocida deben ser debidas a un mismo principio activo. En el caso de que esté presente más de un principio activo, éstos deben estar en igual proporción en ambas preparaciones. Si se cumple esta hipótesis de similitud las funciones que relacionan las respuestas con las dosis deben tener la misma forma para ambas preparaciones en las mismas condiciones experimentales.

Hipótesis Esenciales para la validez estadística

A. *Hipótesis de linealidad*: La relación entre Y (valor esperado de Y) y X debe expresarse por la ecuación de una línea recta por lo menos en el

rango de observaciones utilizadas en el cálculo: Y= a + bX, esta recta puede calcularse por el método de cuadrados mínimos.

B. *Hipótesis de normalidad:* la variable Y se distribuye normalmente para cada nivel de dosis X utilizado en el cálculo.

C. *Hipótesis de Homocedasticidad***:** la varianza de la respuesta o transformación de las mismas es independiente del nivel de dosis utilizado. Para corroborar esta hipótesis puede utilizarse el test de Bartlet en el cual se estudian las diferencias entre las varianzas. Si en una serie de ensayos existe la tendencia a un aumento o disminución de las varianzas de las respuestas con el aumento de las dosis deberá procurarse otra transformación de las respuestas, que sin alterar el cumplimiento de las otras hipótesis, iguale las varianzas en los distintos grupos de dosis.

Preguntas Orientadoras

1. Indique cuando es necesario recurrir a un ensayo biológico.
2. Describa como se clasifican las respuestas en un ensayo indirecto.
3. Describa como demuestra la similitud en un modelo estadístico de líneas paralelas
4. Qué parámetros evaluaría durante la validación de un bioensayo?
5. Qué condiciones se deben cumplir para calcular la potencia relativa en un modelo estadístico de relación de pendientes**.**

Test de Autoevaluación

1. Los ensayos biológicos pueden ser solo realizados en:
   (a) Animales
   (b) Células
   (c) Células y animales
   (d) Animales, células y tejidos

2. Un ensayo biológico debe:
    (a) Siempre reproducir exactamente la actividad biológica del principio activo.
    (b) No siempre debe reproducir exactamente la actividad biológica del principio activo y no debe establecer correlación con la misma
    (c) No siempre debe reproducir exactamente la actividad biológica del principio activo pero debe establecer correlación con la misma.
    (d) Ninguna es correcta

3. En un ensayo directo las respuestas pueden ser:
    (a) Cuantitativas
    (b) Cualitativas
    (c) Cuantitativas y cualitativas
    (d) Ninguna es correcta

4. Para reportar un valor de Potencia relativa, en general es suficiente con:
    (a) Un solo ensayo independiente
    (b) Combinación de varios ensayos independientes
    (c) Combinación de varios ensayos independientes y con resultados homogéneos
    (d) Combinación de varios ensayos independientes, con resultados no homogéneos

5. En los ensayos directos puedo aplicar los siguientes modelos estadísticos para el cálculo de la potencia relativa.
    (a) Líneas paralelas
    (b) Relación de pendientes
    (c) Líneas paralelas y relación de pendientes
    (d) Ninguna de las anteriores.

Bibliografía

1. World Health Organization WHO Technical Report Series, No. 932, Annex 2- (2006) *Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards.*

2. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VIII ed. Vol. 1. Buenos Aires

3. European Pharmacopoeia 3rd Edition. Statistical (2000) *Analysis of Results of Biologicals Assays and Tests* (5.3). Supplement.

4. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 34) (2011) *Design and Analysis of Biological Assays. General Chapter <111>.* Rockville.

5. Pharmacopeial Forum. (2010) *Design and Development of Biological Assays* **–** *General Chapter <1032>*

6. Pharmacopeial Forum. (2010) *Biological assay Validation – General Chapter <1033>*

7. Pharmacopeial Forum.(2010) *Analysis of Biological assays- General Chapter <1034>*

8. Michael. J. Groves. (2006) *Pharmaceutical Biotechnology*, Second Edition, Taylor and Francis

9. M. Would (2006) *Pharmacokinetics and Toxicology of Therapeutics Proteins: Advances and Challenges*. Journal of Biological Chemistry. 3 (4):73-92

10. Lee, J. Wang, Y. Moxness, M. and De Silva, B. (2011) *Bioanalytical Considerations in the Comparability assessment of Biotherapeutics.* Bioanalysis 3 (6): 613-622

11. Roberto Rodriguez Diaz, Tim, Wehr and Stephen Tuck. (2005) *Analytical Techniques for biopharmaceutical Development*. Taylor and Francis.

12. Rosenkranz, A y Glancszpigel, R. (1972) *Valoración de Productos Biológicos.* Revista SAFYBI, Vol. 12, N° 40: 705-708

13. Glancszpigel, R. Y Rosenkranz, A. (1973) *Valoración de Productos Biológicos.* Revista SAFYBI, Vol. 13, N° 41: 762-765

14. Rosenkranz, A y Glancszpigel, R. (1975) *Valoración de Productos*

Biológicos. Revista SAFYBI, Vol. 15, N° 44: 870-877

15. ICH (1999) *Topic Q 6 B, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/ Biological Products*.

CAPITULO 14

TRAZABILIDAD DE MEDICAMENTOS

Pablo Quiroga

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) conjuntamente con los diferentes países del mundo y a través de sus Agencias Regulatorias, desde hace más de 20 años, lucha denodadamente para evitar el ingreso de medicamentos falsificados a la cadena legítima de distribución y que los mismos lleguen a los pacientes, ocasionando diferentes problemas a la salud de los mismos y a los sistemas de salud.

Los productos médicos falsificados (medicamentos, vacunas, derivados sanguíneos, otros productos biológicos, productos diagnósticos, dispositivos médicos, su combinación y sus componentes) constituyen el mayor riesgo a la salud pública para todas las comunidades en el mundo.

Medicamento Falsificado

En 1992 se realiza el primer Workshop sobre "Counterfeits Drugs- Medicinas Falsificadas" organizado por la OMS y la International Federation of Pharmaceutical Manufacturers Associations (IFPMA), en el mismo se acuerda la siguiente definición para medicamento falsificado: "Medicamento falsificado es un producto manufacturado indebidamente, de manera deliberada y fraudulenta en lo que respecta a su identidad o su origen. Pueden incluir productos con los ingredientes correctos o con los ingredientes incorrectos, sin principios activos, con principio activo insuficiente o con envasado falsificado".

La necesidad de una mayor cooperación internacional para combatir los productos médicos falsificados ha sido reconocida por la OMS en sus

resoluciones WHA41.16 (1988), WHA47.13 (1994), WHA52.19 (1999) y WHA57.14 (2004).

El grupo de trabajo para luchar contra la falsificación de medicamentos fue establecido en 1999 en el marco de la Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica. Se realizó un estudio de alcance regional, para determinar la situación relativa a la falsificación de medicamentos en los países de la Región de las Américas. El estudio reveló que la falsificación de medicamentos era un problema que se planteaba en grados diversos en la mayoría de los países de la Región.

En el año 2006 la OMS propone la creación del grupo IMPACT (International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce) y en septiembre de 2006 anuncia su creación. IMPACT es definido como “una coalición voluntaria de partes interesadas, cuyo propósito es coordinar actividades internacionales contra la falsificación de productos médicos, con el propósito de proteger la salud pública”, dicha coalición en el año 2007, elabora una nueva definición de producto médico falsificado en el contexto de los principios de legislación “Un producto médico es falsificado cuando hay una presentación falsa en relación a su identidad [I], historia o fuente [II]. Esto aplica al producto, a su recipiente u otra información del empaque o etiqueta. La falsificación se puede aplicar tanto a productos de marca como genéricos. Las falsificaciones pueden incluir productos con ingredientes/componentes[III] correctos, como ingredientes/ componentes incorrectos, sin ingredientes activos, con cantidades incorrectas de ingredientes activos o con empaques falso. Los defectos de calidad o el no cumplimiento con las Buenas Prácticas de Manufactura o de Distribución (GMP/GDP) en productos legítimos y autorizados no se deben difundir con falsificación”.

En la reunión realizada en la Ciudad de Buenos Aires en noviembre de 2012, los países integrantes de la OMS, acordaron avanzar en el fortalecimiento de las capacidades de regulación de las naciones para combatir la falsificación de medicamentos, destacando el desarrollo de acciones para la educación a los consumidores, los profesionales de la salud y la industria para evitar la falsificación de productos.

Impacto de los medicamentos falsificados

La falsificación de productos médicos, constituye un grave problema de salud pública, que pone en peligro vidas humanas y menoscaba la credibilidad de los sistemas sanitarios. Esos productos comprometen los progresos logrados en materia de salud pública y, además de perjudicar directamente a los pacientes y causar fallos terapéuticos, erosionan la confianza en el sistema de salud en su conjunto.

Los medicamentos falsificados pueden ser perjudiciales para los pacientes de dos maneras: individualmente y a nivel de sociedad. La toma de sustancias adulteradas o la falta de tratamiento pueden dañar a un individuo, desde reacciones adversas inesperadas a la toxicidad, anafilaxis o fracaso terapéutico (ej. en el caso de los antipalúdicos con insuficientes ingredientes activos pueden contribuir a aumentar la farmacorresistencia, la inmunización con una vacuna falsificada no protegerá de una enfermedad) e inclusive hasta la muerte. Los tratamientos incorrectos son un riesgo para la salud pública, ya sea por la transmisión incrementada de la enfermedad o por el desarrollo de resistencia al antibiótico. Además, se puede dañar la credibilidad de un sistema nacional de salud si los medicamentos falsificados ingresan a la cadena de distribución legítima, pues puede inducir en los pacientes temor irracional a tratamientos perfectamente seguros. La falsificación tiene consecuencias sociales y económicas significativas. Más aún, los pacientes pueden recibir productos inseguros o inefectivos y estar, consecuentemente, en apreciable riesgo.

La falsificación es un problema grande en el sistema de salud global. Crecientemente afecta al mundo desarrollado así como al mundo en desarrollo. No se trata meramente de un problema de propiedad intelectual. La salud de pacientes en todo el mundo se ve amenazada.

Una propuesta integrada para abordar los problemas causados por medicinas falsificadas es esencial; la Trazabilidad constituye un elemento clave en la lucha contra las mismas.

Trazabilidad de Medicamentos

La Trazabilidad de Medicamentos puede ser dividida en: la trazabilidad de las materias primas e insumos en los procesos de fabricación, y la *trazabilidad en los procesos de distribución o trazabilidad logística*, de esta última y de las diferentes tecnologías antifalsificación y autenticación, nos encargaremos en el desarrollo de este capítulo.

La trazabilidad de productos farmacéuticos es un elemento clave en una solución efectiva al problema de los medicamentos falsificados.

La palabra trazabilidad no existe en el idioma castellano, el término apropiado sería *rastreo y seguimiento* (track and trace): *rastreo* es la habilidad de conocer la ubicación de un producto en cualquier momento y *seguimiento* es la habilidad de saber dónde ha estado ese producto en el pasado, es decir conocer su historia. *(Ver figura 1).*

La trazabilidad constituye la base para un nivel más alto de seguridad para el paciente, confiriendo la habilidad de controlar desvíos de medicamentos, y falsificación de productos farmacéuticos. Estas prácticas ilegales plantean una amenaza para el consumidor/paciente al introducir drogas potencialmente peligrosas en el mercado.

A continuación se proponen otras definiciones o interpretaciones de trazabilidad: "Capacidad de seguir el rastro de una unidad específica de un producto para la salud a través de la cadena de distribución a medida que éste se mueve entre organizaciones de fabricantes a distribuidores, a hospitales, a pacientes. Los productos son rastreados rutinariamente por obsolescencia, inventario, retiro potencial de la mercadería del mercado, y propósitos logísticos"

"Capacidad de identificar el origen de una unidad en particular y/o la partida del producto, y su localización dentro de la cadena (incluido el hospital) por referencia a registros mantenidos cerca del origen de la secuencia. Los productos son rastreados por propósitos tales como: retiro del mercado, investigación de quejas, y mantenimiento y mejoramiento del producto." (Fuente: GS1 Guía de Trazabilidad, 2001).

Esquematización sistema de rastreo y seguimiento

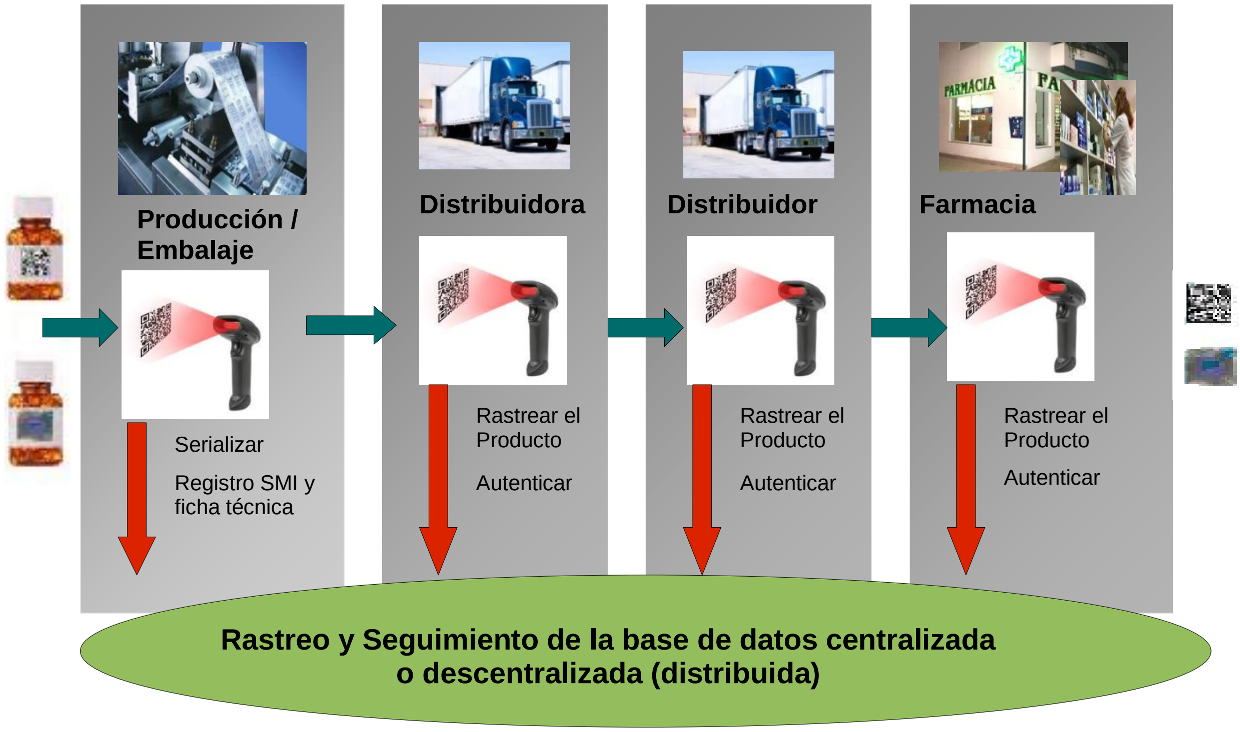


Figura 1. *Esquematización sistema de rastreo y seguimiento*

IMPACT, está constituido entre otros por el grupo IMPACT Working Group on Technology, el mismo tiene como finalidad la evaluación o estudio de las tecnologías disponibles de antifalsificación, rastreo y seguimiento (proceso de registro de todas las transacciones llevadas a cabo para un determinado envío durante toda la cadena de distribución). La identificación del ciclo de vida de un medicamento, desde el punto de fabricación hasta la cama del paciente, con todos los pasos y actores involucrados definidos, aumenta la seguridad del proceso de administración del medicamento, aumentando significativamente la seguridad del paciente y reduciendo el riesgo de la cadena de distribución.

La trazabilidad es parte de las Buenas Prácticas de Manufactura[IV] (GMP) promulgadas por la Administración Federal de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) [V]; esto significa que los fabricantes deben rastrear sus productos desde su origen hasta la primera entrega (mayorista u hospital). Para lograrlo, los fabricantes han desarrollado soluciones que son altamente efectivas, siempre y cuando los productos estén en su propia esfera de

influencia. Así, sumado a su número de identificación, los productos tienen que portar un número de lote y la fecha de vencimiento. El seguimiento es también parte de las Buenas Prácticas de Distribución y Almacenamiento (GDP y GSP respectivamente) que los mayoristas deben respetar.

En la 63º Asamblea Anual Mundial de Salud -OMS- llevada a cabo el 22 de abril de 2010 en la página 5, se describen las directrices generales sobre garantía de Calidad las cuales incluyen recomendaciones que abarcan desde el desarrollo y la producción del medicamento hasta su distribución a los pacientes, estas directrices figuran en el sitio Web de la OMS bajo el título “Temas de Salud”, haciendo referencia a la trazabilidad logística, por lo tanto, la trazabilidad se basa en las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP), las Buenas Prácticas de Distribución (GDP) y las Buenas Prácticas de Almacenamiento o Conservación (GSP).

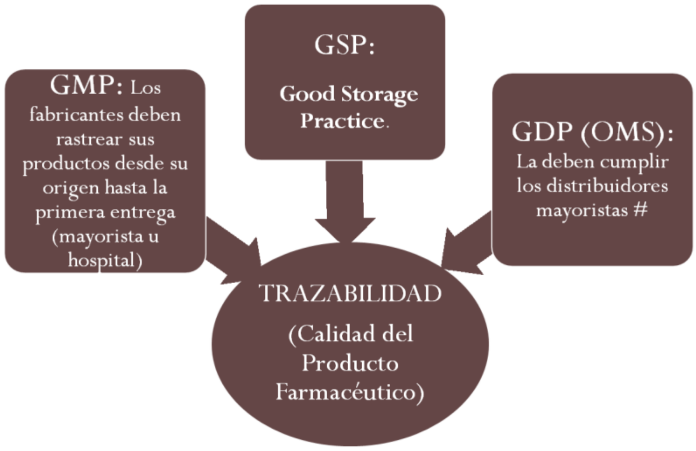


Figura 2. *Buenas Prácticas- base de la trazabilidad*

El seguimiento de fármacos, del fabricante al paciente, todavía no se ha logrado a nivel mundial y el mismo solo se puede lograr si se cuenta con una identificación adecuada del producto.

Identificación y codificación de productos farmacéuticos

La codificación única y estandarizada de los medicamentos puede llevar a oportunidades de mejorar la seguridad del paciente y elevar la seguridad y eficiencia de la cadena de distribución, con una mejor posibilidad de rastreo de los medicamentos en el mundo.



Figura 3. *Relación Codificación y seguridad del paciente*

Tecnologías Antifalsificación

El objetivo o función primario de las tecnologías de antifalsificación, es la autenticación del producto médico, por las agencias regulatorias, la industria farmacéutica e idealmente por el público en general.

Las tecnologías antifalsificación se pueden clasificar en las categorías siguientes:

1. *Visibles (Overt)*
2. *Ocultas (Covert)*
3. *Marcadores o Técnicas Judiciales (Forensic Techniques)*

4. *Serialización /Rastreo y Seguimiento (Serialization/Track ad Trace).*

1. Tecnologías visibles (Overt): estas tecnologías o características están destinadas a permitir a los usuarios finales (en este caso pacientes) verificar la autenticidad del producto, dentro de este grupo tenemos: hologramas, dispositivos ópticamente variable, films y tintas de seguridad, gráficos de seguridad y numeración secuencial de los productos.

A continuación, se describen las ventajas y desventajas de las tecnologías visibles de autenticación.

Ventajas	Desventajas
Verificación por el usuario / paciente	Requieren educación del usuario/ paciente y no siempre es ampliamente interpretada
Tecnologías nuevas más seguras	Pueden ser fácilmente imitadas
Pueden agregar un atractivo decorativo	Pueden adicionar un costo significativo
Pueden actuar como disuasorios para los falsificadores	Pueden depender o basarse en características ocultas para su autenticación
	Pueden ser reutilizadas
	Pueden dar una Falsa seguridad

Tabla 1. *Ventajas y desventajas de las tecnologías visibles de autenticación*

2. Tecnologías ocultas (Covert)

El objetivo de estas tecnologías, es permitir al propietario de la marca identificar productos falsificados, respecto del público general o pacientes, los mismos no tienen los medios para percibir su presencia o para verificar los mismos, no son fácilmente detectables o copiables sin un conocimiento especializado. Si las características encubiertas son comprometidas o publicitadas, su valor de seguridad puede perderse parcial o totalmente, dentro de este grupo podemos describir: impresión invisible, imagen integrada, marcas de agua digitales, marcas ocultas o impresas, diseño anticopia o antiescan, códigos laser, sustratos, olor, etc. A continuación, se describen las ventajas y desventajas de las tecnologías de autenticación ocultas.

Ventajas	Desventajas
Pueden ser simples y con bajo costo de implementación	Se necesita estricto secreto
Necesitan aprobación regulatoria	Si es ampliamente utilizado o conocido es fácilmente copiable
Pueden ser fácilmente agregadas o modificadas	Opciones más seguras agregan complejidad y costo
Puede ser aplicado en la propia empresa (in-house) o a través de los proveedores de los componentes	Si es aplicado a través de los proveedores de componentes existe mayor riesgo de que se filtre la información

Tabla 2. *Ventajas y desventajas de las tecnologías ocultas*

3. Marcadores o Técnicas Judiciales (Forensic Techniques)

Soluciones de alta tecnología las cuales requieren test de laboratorios o Kits específicos para proveer autenticidad científica, estos marcadores representan un subgrupo de tecnologías o características ocultas o encubiertas, pero difieren con las mismas en la metodología requerida para la autenticación, podemos enumerar: etiquetas o marcadores químicos, biológicos o de ADN (Ácido Desoxiribonucleíco), relaciones isotópicas, micromarcadores o microetiquetas.

4. Serialización

La serialización implica asignar una identidad única a cada unidad de stock durante la fabricación, el cual se mantiene a lo largo de la cadena de comercialización hasta su consumo, esta identidad normalmente incluirá detalles del nombre del producto, concentración/dosis, N° de lote y fecha de Vencimiento. El objetivo de la serialización permite:

- Rastrear un determinado medicamento, a través de la cadena de comercialización, en cada punto donde es factible capturar datos.
- Proveer trazabilidad a lo largo de la historia de cualquier medicamento, (denominado *Pedigree Electrónico*) la cual está sujeta a los puntos de control.
- Permitir la autenticación de los datos en cualquier momento y por lo tanto del pack o unidad sobre el cual se aplicó.

El beneficio más obvio de la serialización, se observa en la logística de la cadena de comercialización, donde una mayor transparencia en los inventarios y los patrones de demanda pueden conducir a mejorar la eficiencia y reducir los costos. Otro beneficio es la habilidad o capacidad de identificar un producto dispensado a un paciente, impidiendo errores en la medicación y la posibilidad de detectar lotes de productos defectuosos rápidamente. La capacidad de controlar estrictamente y autenticar todos los productos a través de la cadena de comercialización, reduce enormemente las posibilidades de falsificación, robo y/o que diversos productos falsificados ingresen a la cadena de distribución legitima sin ser detectados.

Si bien el rastreo y seguimiento por sí mismo puede no ser inmune a la copia o falsificación, su seguridad esta enormemente asegurada, por la inclusión de una serialización única y aleatoria o numeración no secuencial, aplicada idealmente a los niveles del envase individual del medicamento. Si la serialización fuera secuencial el nivel de seguridad puede disminuir, debido a que la secuencia es predecible, mientras que la serialización al azar utilizando algoritmos altamente seguros o métodos de encriptado aumenta su seguridad. Los packs individuales aún pueden ser copiados, pero la base de datos identificará duplicados o número de serie inválidos como también aquellos que han sido cancelados o han vencido, o con detalles del producto no válidos.

Cuando la serialización es segura y es aplicada en forma visible a un pack puede ser autenticada por el paciente, ya sea por vía telefónica o internet, linkeado a la base de datos. Esta codificación única y estandarizada de los medicamentos puede llevar a oportunidades de mejorar la seguridad del paciente y elevar la seguridad y eficiencia de la cadena de distribución, con una mejor posibilidad de rastreo de los medicamentos en el mundo. La forma más común de auto-identificación es el código de barra, que ha estado disponible por años y es una tecnología estándar generalmente aceptada. Su principal limitación es la cantidad de información que puede contener un código de barra tradicional. Sin embargo, los más recientes códigos de matriz de datos permiten que las etiquetas contengan conjuntos de caracteres ASCII (American Standard Code for Information Interchange) completos y usen múltiples modos

de codificación que permiten hasta 2335 caracteres. Los códigos de Barras están compuestos por líneas de alta densidad o códigos de barras bidimensionales, los cuales incorporan la identidad a nivel de la unidad de envase, los que son escaneados y referenciados a una base de datos externa. Una implementación popular es el código DataMatrix de dos dimensiones, y otra posibilidad incluye códigos PDF417. Un código de dos dimensiones típico puede abarcar 1 cm^2 o menos, y aún contener hasta un Kbyte de datos. Cuando el espacio no es una limitación los códigos de barras lineales pueden ser utilizados. Los códigos pueden ser impresos, por métodos online incluyendo inkjet o impresión digital, lo que permite la operación a través de una computadora y la transferencia de los registros a una base de datos central. Se han desarrollado sistemas jerárquicos donde la etiqueta de una caja de envío, está sujeta a la identidad de todo el contenido de la caja y esto puede extenderse hasta la cadena de etiquetado de los pallets, lo que implica la necesidad de escaneo en línea a través de la cadena de distribución.

Las tecnologías conocidas como de nanoimpresión, permiten la aplicación microscópica en tabletas individuales. El uso de tintas UV permiten impresiones invisibles sobre cualquier superficie incluyendo ampollas y viales de vidrio

La otra tecnología de identificación principal es, Identificación por Radio Frecuencia (RFID). Esta tecnología crece en aceptación y tiene ahora considerable potencial para la industria farmacéutica, se proyecta que la tecnología RFID será una tecnología disponible y viable en un futuro cercano. La Identificación por Radiofrecuencia, implica la utilización de una antena con un microchip ubicado en su centro, este último contiene información específica del producto y el lote, la cual puede ser leída a distancia, sin la necesidad de estar frente al producto, una diferencia sobre el código de barras. La radiofrecuencia utilizada determina el rango y sensibilidad, sin embargo una sola especificación no necesariamente cubrirá todas las aplicaciones. Algunos sistemas permiten la captura de registros múltiples a partir de una mezcla de productos distintos, sin embargo hay algunos problemas relacionados con la orientación de las etiquetas y de la absorbancia de la señal de radio por líquidos y films. Una clara ventaja del RFID es que tiene el potencial para ser

totalmente automatizado en las droguerías e inclusive en farmacias, sin la necesidad de intervención manual.

Actualmente se están desarrollando especificaciones para los equipos y datos estándar. El costo del este tipo de etiquetado continua siendo una barrera para la aplicación sobre packs individuales. La robustez de este tipo de etiquetado durante la aplicación y el manejo a través y hasta el final de la vida útil es otro problema.

La selección de la tecnología depende entre otros aspectos, del espacio con que se dispone para la codificación, cantidad de datos a codificar, de la disponibilidad de tecnología de seguridad, que no perjudique el producto y provea una tasa de exactitud de lectura de más del 99,9%. La simple verdad es que cualquier etiqueta electrónica mejorará los procesos de la cadena de abastecimiento, aumentando la eficiencia y los márgenes de ganancia así como reduciendo la amenaza de falsificación y robo. Promoverá mejor servicio y control de existencias, reducirá reintegros y permitirá mejor control de retiro de productos.

A continuación describiremos los sistemas de trazabilidad implementados o a implementar en un futuro en nuestro país, Europa, Estados Unidos y Brasil.

Trazabilidad en Argentina

En el año 2011, el Ministerio de Salud de La Nación, establece por Resolución 4357/2011 la implementación del Sistema Nacional de Trazabilidad, y el 23 de mayo del 2011, La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) emite la Disposición 3683/2011, en la cual se describen los lineamientos para la implementación del mismo, por otra parte se da a conocer la Guía Técnica Estándar de Codificación y Trazabilidad de Medicamentos, en la cual se describe la Identificación Univoca de Medicamentos, la cual es mandataria y corresponde a aquella que posibilitará la identificación de cada producto y deberá ser asociada físicamente a cada unidad de producto, dicha identificación responde a las claves de

identificación del estándar Global GS1, específicamente: el GTIN o Número Mundial de Artículo Comercial, acompañado de un número seriado único por cada estuche secundario. De forma adicional, optativo, se puede incluir el Número de Lote y el Vencimiento.

En general, un portador de datos, es un medio para representar en formato legible por equipos de lectura datos, el cual es utilizado para permitir la captura automática de la información contenida, siendo los más frecuentes los códigos de barras, códigos matriciales y etiquetas de Radio Frecuencia (RFID) descriptos anteriormente. En particular el portador de datos adecuado para la marcación de los medicamentos adoptado, corresponde al símbolo GS1Datamatrix ECC-200, el cual se muestra a continuación.

Figura 4. *Esquematización símbolo GS1Datamatrix ECC-200*

A los efectos de facilitar el inicio del proceso de trazabilidad, se considera apto durante las etapas iniciales de implementación, la utilización de los portadores: GS1-128 y RFID, los cuales son compatibles con la simbología Datamatrix adoptada, por ser el portador mundialmente reconocido y recomendado para la identificación de medicamentos. Es requisito en todos los casos, en adición al portador, incorporar la legibilidad humana asociada, para permitir el entendimiento por las personas. Tanto el código de Lote, como la Fecha de Vencimiento son datos requeridos al momento de efectuar la transacción de los eventos, y deberán estar vinculados al GTIN y Número de Serie. Opcionalmente pueden ser incluidos dentro del mismo transportador de datos, utilizado para la representación del GTIN y el Número de Serie. Se destaca en caso de incorporarlos a las codificaciones lineales, garantizar no obstruir la lectura de los datos de identificación unívoca.

Si bien la identificación de las mismas no es de cumplimiento mandatorio, las mismas contribuirán a una mejor administración de los diferentes niveles de empaque de productos. Se entiende por Unidad de Despacho a la agrupación de Unidades Logísticas: Un artículo de cualquier composición establecido para el transporte y/o almacenamiento que necesita ser administrado a lo largo de la cadena de abastecimiento. Se recomienda utilizar para la identificación de las unidades logísticas un portador de datos GS1-128 con la cadena de elementos GTIN + N° de Serie. En el caso de identificación de Pallets el estándar GS1 a utilizar debe ser el SSCC (Serial Shipping Container Code). Identificación de Empaque Secundario con Información Adicional: Tanto un portador Datamatrix ECC-200, como así también el código GS1-128 permiten almacenar otro tipo de información que puede ser de utilidad para los integrantes de la cadena de abastecimiento del Sector Salud. La adición del Vencimiento y del Lote son optativas, y no deben entorpecer la lectura de los datos de identificación univoca. A continuación se describe un Ejemplo GS1 Datamatrix ECC 200 – GTIN + Vencimiento + Lote + N° de Serie



Figura 5. *Esquematización GS1 Datamatrix ECC 200 – GTIN + Vencimiento + Lote + N° de Serie*

Identificación de Pallets y Unidades de Despachos: Para el manejo de este set de unidades logísticas, puede considerarse la utilización de tecnología RFID/EPC a fin de poder agilizar los procesos logísticos de alto volumen. En movimientos a escala esta solución es la considerada más apta.

Trazabilidad en Europa

El 4 de julio del 2011, se pública en el Diario Oficial de la Unión Europea (UE), la Directiva 2011/62/UE, sobre Medicinas Falsificadas, La nueva Directiva modifica la 2001/83/CE, en lo relativo a la prevención de la entrada en la cadena de suministro legal de medicamentos que son falsificados en cuanto a su identidad, su historial o su origen e introduce dispositivos de seguridad para garantizar la identificación, la autenticidad y la trazabilidad de los medicamentos desde su fabricación hasta el consumidor final, se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano, La nueva legislación actualiza las normas vigentes e introduce dispositivos de seguridad que han de incorporarse a los envases de los medicamentos con el objetivo de garantizar su autenticidad, identificar cajas individuales y verificar si se ha tratado de alterar el envase externo, los mismos incluyen, una etiqueta o envase a prueba de manipulaciones así como la serialización a nivel de artículo unitario en forma de un número único e individual y no predictivo, legible tanto por el ojo humano como por lectores portátiles de datos. En la Comunidad Europea, se considera cómo el formato más probable para incluir dicha serialización, el código de barras tipo 2D, DataMatrix. Como norma general, estos dispositivos deberán aplicarse a todos los medicamentos de venta bajo receta, excepto para aquellos casos en que se considere que no exista posibilidad de riesgos para la salud. Solo se utilizarán en los medicamentos que no requieren prescripción, en casos excepcionales si hay riesgo de falsificación.

En caso de que el medicamento vuelva a ser envasado, los dispositivos de seguridad deberán ser sustituidos por otros equivalentes. La directiva antes mencionada, regula también las ventas de productos farmacéuticos en internet, ya que la misma representa una de las principales vías de entrada en el mercado legal de la UE. No en todos los Estados es legal vender fármacos por internet pero, en aquellos en los que sí lo es, los vendedores deberán conseguir una autorización especial, portar un logo europeo y además estar catalogados en una página web a nivel estatal y en una base de datos

europea. A través de este logo, los pacientes podrán identificar las farmacias autorizadas, que estarán conectadas a una web central en cada Estado miembro.

Las webs nacionales estarán, a su vez, enlazadas a una web europea. La European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA) recomienda para la identificación y codificación de los productos farmacéuticos a nivel Europeo: Cuatro items de datos son codificados en una matriz a nivel del envase secundario individual.



Figura 6. *Datos a codificar en la matriz del envase secundario individual*

EFPIA a diferencia del sistema de trazabilidad Argentino, propone la identificación en el punto de dispensa, dicho sistema se esquematiza en la figura siguiente.

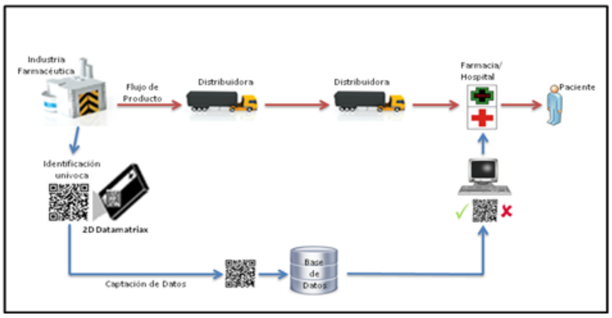


Figura 7. *Esquema del sistema de Identificación en el punto de dispensa*

Trazabilidad en Estados Unidos

En febrero del 2004, la Food and Drug Administration (FDA), emite el documento Combating Counterfeit Drugs (Combatiendo las Drogas Falsificadas), en el mismo reconocía la importancia y el potencial de la tecnología electrónica de seguimiento-y-rastreo para hacer más segura la distribución de drogas, y propone implementar la tecnología de Identificación por Radiofrecuencia (RFID), también propone Tecnologías de autenticación: Hologramas, etiquetas, tintas que cambian de color, marcadores químicos, etc., para garantizar la autenticidad tanto del envase como del producto farmacéutico e indica que FDA probablemente no especificará una sola tecnología de autenticación para que los falsificadores potenciales no se concentren en vencer un solo método. En el mismo propone el etiquetado de productos farmacéuticos y biológicos a nivel de unidad de dosis de uso, con un código de barra lineal el cual debería contener los datos que se esquematizan a continuación.

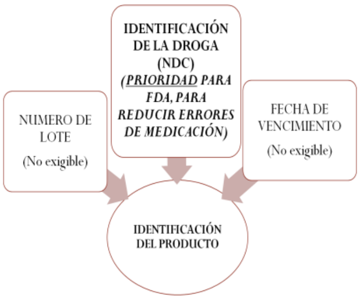


Figura 8. *Datos a etiquetar a nivel de unidades de uso.*

En septiembre del año 2007, FDA requiere desarrollar, identificar y validar, tecnologías efectivas para las drogas bajo prescripción, con el propósito de asegurar la cadena de distribución de medicamentos, en su lucha contra las medicinas falsificadas,

En marzo del 2010, FDA, da a conocer la Guidance: Standards for Securing the Drug Supply Chain-Standardized Numerical Identification for Prescription Drug Packages, en la misma se describe el desarrollo de una identificación numérica

normatizada para las drogas de prescripción o bajo receta, solamente a nivel del envase individual. La identificación numérica normatizada/estandarizada, debe realizarse con el Código Nacional de la Droga Serializado, el mismo está compuesto por el producto farmacéutico específico combinado con un número de serie específico (numérico o alfanumérico) con no más de 20 caracteres, este último es generado por el elaborador o el encargado del reempaque para cada envase individual, a continuación se propone el ejemplo de la Guidance antes mencionada.

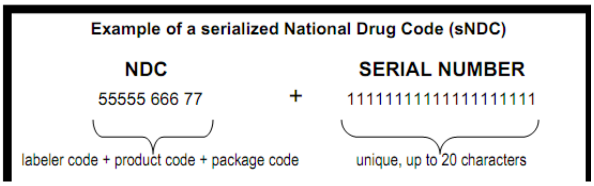


Figura 9. *Ejemplo Código Nacional de las Drogas Serializado.*

La identificación numérica normatizada/estandarizada, no incluye el Número de Lote y / o la Fecha de vencimiento, debido a que por las regulaciones del FDA, dicha información debe estar en la etiqueta de cada envase. Los elaboradores si lo consideran apropiado pueden incluir igualmente está información y en ese caso la información debe ser acorde con el Estándar Global 1 (GS1).

La identificación numérica normatizada/estandarizada, deberá ser legible tanto por el ojo humano como por lectores portátiles de datos. La tecnología puede ser tanto códigos de barras 2D o RFID.

Trazabilidad en Brasil

El 14 de enero de 2009, Brasil, aprueba la Ley N° 11903, la cual crea el Sistema Nacional de Control de Medicamentos, La Ley establece el rastreo de todo tipo de medicamentos existentes en el país, desde el fabricante hasta su venta al consumidor final. El control debe llevarse a cabo con tecnologías para la captura electrónica, almacenamiento y transmisión de datos. Cada producto mostrará un exclusivo código de identificación.

El código bidimensional, el GS1 DataMatrix (ECC 200) internacionalmente aceptado, es adoptado y el mismo debe ser impreso sobre empaquetados secundarios, propone el uso de un código Identificador Unico de Medicamentos (IUM, según sus siglas en portugués), "constituido por un número individual, no repetitivo, de 13 dígitos que debe colocarse en el envase codificado por Datamatrix y también expresado en caracteres numéricos legibles. El Identificador Unico de Medicamentos será generado y gerenciado por ANVISA. El código de barras deberá incluir la siguiente información sobre el producto: GTIN, número de lote, fecha de vencimiento, y número de serie, se describe también el uso del código de barras GS1-128 con clave SSCC sobre la unidad logística (caja) para asegurar la conexión con el contenido (empaquetados secundarios). El sistema en vías de implementación en Brasil es comparable al implementado en nuestro país

Conclusiones

La lucha contra los medicamentos falsificados es una estrategia de largo plazo, respaldada por inversión y compromiso significativo de recursos cuyo objetivo es: Minimizar el riesgo de que los medicamentos falsificados lleguen a los pacientes. El seguimiento y rastreo de productos farmacéuticos es un elemento clave en una solución efectiva al problema de medicamentos falsificados, una acción Paneuropea sería necesaria para crear un sistema eficiente y viable.

La adopción y el uso común de tecnologías de rastreo y localización confiables ayudaran a garantizar la integridad de la cadena de suministro de fármacos al proporcionar el historial exacto de un fármaco, lo cual constituye un expediente seguro que documenta que el fármaco fue fabricado y distribuido bajo condiciones seguras (FDA 2004). Las tecnologías de autenticación para fármacos han sido perfeccionadas lo suficiente como para poder servir ahora como un componente crítico de cualquier estrategia para proteger a los productos contra la falsificación. (FDA 2004).

La identificación del ciclo de vida de un medicamento, desde el punto de fabricación hasta la cama del paciente, con todos los pasos y actores involucrados definidos, aumenta la seguridad del proceso de administración del medicamento, aumentando significativamente la seguridad del paciente y reduciendo el riesgo de la cadena de distribución.

Preguntas Orientadoras

1. Defina Trazabilidad Logística y sus objetivos.
2. Describa las diferencias fundamentales entre Código de barras 2D y RFID.
3. Describa de manera resumida el Sistema de Trazabilidad de nuestro país.
4. Describa el Sistema de alerta temprana de la OMS y sus objetivos.

Test de Autoevaluación

1. La tecnología para serialización son
    - (a) Códigos de barras unidimensionales.
    - (b) Códigos de barras 2D
    - (c) Identificación por Radiofrecuencia (RFID)
    - (d) Ninguna de las anteriores es correcta
    - (e) Todas son correctas

2. La identificación numérica normatizada/estandarizada, propuesta por FDA para los medicamentos bajo receta, propone
    - (a) El Código Nacional de la Droga.
    - (b) El código Nacional de la Droga + la fecha de vencimiento y el N° de lote.

(c) El Código Nacional de la Droga + un número de serie específico (numérico o alfanumérico) con no más de 20 caracteres.

(d) El Código Nacional de la Droga + un número de serie específico (numérico o alfanumérico) con no más de 20 caracteres + la fecha de vencimiento y el N° de lote.

3. El Sistema Nacional de Control de Medicamentos de Brasil propone

(a) La Tecnología RFID

(b) La Tecnología RFID + Código de Barras 2D

(c) Código de Barras 2D

(d) Código de Barras 2D + código de barras GS1-128 con clave SSCC.

Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud. (2008). *Falsificación de Productos Médicos*., *EB 114/14*.

2. Organización Mundial de la Salud. (2009). *Falsificación de Productos Médicos*, A62/13.

3. Organización Panamericana de la Salud. *Combate a la Falsificación de Medicamentos, Propuesta de programas nacionales de prevención de la falsificación de medicamentos y plan de acción (Road Map).*

4. Organización Panamericana de la Salud. (2005). *IV Conferencia Panamericana Sobre Armonización de la Reglamentación Farmacéutica*.

5. Christian Hay. (2004). *Códigos de Barras Farmacéuticos: La Necesidad de Legislación. Reimpreso de la Farmacia Hospitalaria en Europa. N° 15. Pp. 37-37*

6. Organización Mundial de La Salud. (2011). *IMPACT International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce.*

7. James Killick y David Strelsyk Herzog. (2007). *Seguimiento y rastreo de productos Farmacéuticos en la Unión Europea*: *Un Elemento Clave en la Lucha Contra Medicinas Falsificadas*. Pharmaceutical Law Insight.

8. Sociedad Farmacéutica Real de Gran Bretaña. MHRA. (2008).*Medicamentos falsificados.. Guía para Farmacéuticos*.

9. Andre Grigjanis. (2007). *Proveyendo Trazabilidad en la Cadena de Distribución Farmacéutica*.

10. Ministerio de Salud de la Nación. *Resolución 4357/2011*.

11. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). *Disposición 3683/2011*.

12. Diario Oficial de la Unión Europea (UE). *Directiva 2011/62/UE*.

13. Federación Europea de Asociaciones e Industrias Farmacéuticas. Posición oficial. *Identificación y codificación de productos farmacéuticos en Europa.*

14. Consejo General de Colegios Médicos de España. (2011). *Boletín Europa al Día*, N° 376.

15. Food and Drug Administration (FDA). (2004). *Combating Counterfeit Drugs*.

16. Food and Drug Administration (FDA). (2010). *Guidance: Standards for Securing the Drug Supply Chain-Standardized Numerical Identification for Prescription Drug Packages*.

17. Presidencia de La Nación Argentina. (2012). *Guía Técnica Estándar de Codificación y Trazabilidad de Medicamentos.*

18. República Federativa de Brasil. (2009). *Ley N° 11903 Sistema Nacional de Control de Medicamentos.*

19. Stephen Barlas. (2011). *Track- and -Trace Verification*. P and T.36 (4).

20. Guerra, J,M. (Abril 2011). *Entrevista a Mario Abitbol, Líder de Desarrollo de Salud de GS1 Argentina*. Publicación Electrónica- Management En Salud.

Notas

[I] Por ejemplo, cualquier declaración equívoca con respecto al nombre, composición, concentración, u otros elementos.
[II] Por ejemplo, cualquier declaración equívoca con respecto al fabricante, país de manufactura, país de origen, titular de la autorización de comercialización.
[III] Se refiere a ingredientes o cualquier otro componente de productos médicos.
[IV] GMP = Good Manufacturing Practices
[V] US FDA = United States Food and Drug Administration

ANEXO I
Respuestas a los Test de Autoevaluación

Capítulo 1. Introducción al Control de Calidad de Medicamentos

1. (b)
2. (b)
3. (d)
4. (b)

Capítulo 2. El Método Analítico en el Control de Calidad

1. (c)
2. (d)
3. (a)
4. (b)
5. (c)
6. (c)

Capítulo 3. Cromatografía en Capa Fina (TLC):

1. (c)
2. (d)
3. (c)
4. (c) y (d)

Capítulo 4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

1. (a)
2. (c)
3. (b)
4. (c)
5. (a)
6. (c)

7. (c)
8. (a)
9. (b)

Capítulo 5. Electroforesis Capilar

1. (c)
2. (c)
3. (b) y (c)
4. (c)

Capítulo 6. Métodos espectroscópicos aplicados al Análisis Farmacéutico

1. (b)
2. (d)
3. (c)
4. (a)
5. (c)

Capítulo 7. Métodos de Análisis Térmicos

1. (c)
2. (c)
3. (d)
4. (c)
5. (d)

Capítulo 8. Determinación de Agua

1. (b) y (c)
2. (a) y (c)
3. (b) y (c)
4. (c)

Capítulo 9. Análisis Funcional

1. F
2. V
3. F
4. V
5. F
6. F
7. V

Capítulo 10. La Prueba de Disolución

1. (d)
2. (b)
3. (b)
4. (c)
5. (c)

Capítulo 11. Uniformidad de Unidades de Dosificación

1. (b)
2. (c)
3. (a)
4. (b)
5. (b)
6. (a) y (c)
7. (a)
8. (b)
9. (a)
10. (c)

Capítulo 12. Estabilidad de Drogas y Medicamentos

1. (b)

2. (b)
3. (a)
4. (a)
5. (b)

Capítulo 13. Ensayos Biológicos

1. (d)
2. (c)
3. (d)
4. (c)
5. (c)

Capítulo 14. Trazabilidad de Medicamentos

1. (e)
2. (c)
3. (d)

LOS AUTORES

María Guillermina Volonté

Farmacéutica y Doctora en Ciencias Farmacéuticas (Facultad de Ciencias Exactas – Universidad Nacional de La Plata). Se especializó en el Área de Garantía de Calidad de Medicamentos y Biofarmacia. Profesora Titular con Dedicación Exclusiva en la asignatura Control de Calidad de Medicamentos de la Carrera de Farmacia y en la Maestría en Plantas Medicinales (Facultad de Ciencias Exactas – UNLP). Profesora en la Carrera de Especialización en Farmacia Clínica y Atención Farmacéutica (Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia – Universidad Nacional de San Luis). Profesora invitada en la Universidad Nacional del Sur y en la Universidad Andina Simón Bolívar de Sucre. Integrante de la Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina. Académica Titular de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica. Coordinadora de la Carrera de Farmacia (Facultad de Ciencias Exactas – UNLP). Autora y coautora de publicaciones en revistas indexadas y de comunicaciones científicas en Congresos de su especialidad. Ha dictado numerosos cursos de posgrado y conferencias en temáticas relacionadas con el área de su labor docente y de investigación. Directora y codirectora de proyectos de investigación y de extensión en el área de su especialidad en la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP). Jurado en Concursos de Profesores y de Tesis de Doctorado en distintas Universidades de Argentina y del exterior. Reviewer de Revistas Científicas nacionales y extranjeras. E-mail: kv@biol.unlp.edu.ar

Pablo Quiroga

Farmacéutico y Licenciado en Ciencias Farmacéuticas (Facultad de Ciencias Exactas – Universidad Nacional de La Plata). Experto Universitario en Toxicología y Master Universitario en Toxicología (Rectorado Universidad de Sevilla - España). Profesor Adjunto en las asignaturas Control de Calidad de

Medicamentos y Toxicología Farmacéutica de la Carrera de Farmacia (Facultad de Ciencias Exactas – UNLP). Miembro de la Subcomisión de Controles Toxicológicos de la Farmacopea Argentina. Coautor de publicaciones en revistas indexadas y de comunicaciones científicas en Congresos de su especialidad. Jefe del Departamento de Investigaciones Farmacológicas de Laboratorios Bagó S.A. Reviewer de Revistas Científicas. E-mail: quirogapablo@yahoo.com.ar